

**ROL DE LOS FITOCROMO B1 Y B2 EN LOS RASGOS ARQUITECTURALES Y EN LA HABILIDAD
COMPETITIVA DE LAS PLANTAS DE MAÍZ (*Zea mays* L) ANTE CAMBIOS EN LA DENSIDAD DE
SIEMBRA.**

*Tesis presentada para optar al título de Magister de la Universidad de Buenos Aires,
Área Producción Vegetal*

Germán Wies
Ingeniero Agrónomo - FAUBA - 2011

Cátedra de Cerealicultura- Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires



Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

Gustavo Ángel Maddonni

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

Doctor (Universidad de Buenos Aires)

Consejero de Estudios

Jorge José Casal

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

Doctor (Universidad de Buenos Aires)

JURADO DE TESIS

Gustavo Ángel Maddonni

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

Doctor (Universidad de Buenos Aires)

JURADO

Juan Pablo Monzón

Ingeniero Agrónomo (Universidad Nacional de Mar del Plata)

Doctor en ciencias agrarias (Universidad Nacional de Mar del Plata)

JURADO

Jorge A. Zabala

Ingeniero agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

Doctor Rerum Naturalis (Friedrich-Schiller-Universität)

Fecha de defensa de la tesis: 27/10/2014

Dedicatoria:

A la familia y amigos que me dieron raíces para llegar hasta aquí...

A los amigos de la facultad, chispas de ideas y largos debates...

A mi compañera que continúa el camino a mi lado...

Agradecimientos:

A Gustavo Maddonni por abrirme las puertas y darme innumerables posibilidades de crecimiento personal y profesional.

Al grupo humano de la cátedra de cereales por darme un lugar entre ellos...

A mi familia que sin su apoyo incondicional no hubiera sido posible que llevara a cabo mis estudios...

A todos aquellos amigos, de la cátedra, de mi pueblo, del club y de la vida que me acompañaron hasta ahora, cada uno en su correcto momento y espacio...

A mi compañera Ana Clara, fiel contenedora en los momentos de fatigas, enojos, incertidumbres etcéteras...

Gracias a todos!!!

Declaración:

“Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original, producto de mi propio trabajo y que este material ha sido presentado, en forma parcial, en mi tesis de grado (solo datos de las figuras 2.3 y 2.5) aunque no ha sido presentada como otra tesis en ésta u otra institución.”

Ing. Agr. Germán Wies

Índice General:

Índice General:	vi
Índice de figuras:	1
Índice de tablas:	5
Abreviaturas utilizadas:	6
Resumen:	7
Capítulo 1.....	9
Introducción General	9
1.1- Introducción	10
1.1.1 <i>El cultivo de maíz y su sistema de producción</i>	10
1.1.2 <i>El ambiente lumínico en el canopeo</i>	10
1.1.3 <i>Fotorreceptores y respuestas foto-morfogénicas a nivel de planta y de cultivo</i>	11
1.1.4 <i>Variabilidad poblacional y habilidad competitiva de las plantas</i>	13
1.2-Objetivos	15
1.2.1 <i>Objetivos particulares:</i>	15
1.3-Hipótesis	15
Capítulo 2.....	17
2.1- Introducción	18
2.2 Materiales y métodos	19
2.2.1 <i>Diseño experimental</i>	19
2.2.2 <i>Culturas</i>	20
2.2.3 <i>Mediciones</i>	21
2.2.3.1 <i>Biomasa y crecimiento de las plantas</i>	21
2.2.3.2 <i>Área foliar, anatomía de las hojas y distribución azimutal de las hojas</i>	22
2.2.3.3 <i>Calidad de la luz, captura de luz, crecimiento y eficiencia en el uso de radiación</i>	23
2.2.3.4 <i>Rendimiento en grano y sus componentes</i>	24
2.2.4 <i>Análisis estadísticos</i>	25
2.3. Resultados	25
2.3.1 <i>Biomasa de las plantas</i>	25
2.3.2 <i>Altura de las plantas y diámetro de los tallos</i>	27

2.3.3 Área foliar	29
2.3.4. Anatomía de las hojas	29
2.3.5. Distribución azimutal de hojas.....	33
2.3.6. Ambiente lumínico en el canopeo, eficiencia en el uso de la radiación (EUR) y tasa de crecimiento del cultivo.....	34
2.3.7. Producción de biomasa y rendimiento de los cultivos	37
2.4. Discusión	39
2.5. Conclusiones.....	44
Capítulo 3.....	46
3.1. Introducción	47
3.2. Materiales y métodos	48
3.2.1. Diseño experimental.....	48
3.2.2. Mediciones.....	48
3.2.3 Estimación de la variabilidad poblacional en mono-culturas y comportamiento de las iso-líneas en poli-culturas	48
3.2.4. Análisis de datos	49
3.3. Resultados	50
3.3.1. Variabilidad poblacional de la biomasa de las plantas en mono-culturas	50
3.3.2. Crecimiento de cada genotipo en poli-culturas	51
3.3.3. Altura y área foliar.....	54
3.3.4. Tasa de crecimiento alrededor de floración de las plantas de cada genotipo en las poli-culturas	58
3.3.5. Rendimiento por unidad de superficie de poli-culturas vs. mono-culturas, contribución al rendimiento de cada genotipo en las poli-culturas y LER	61
3.4. Discusión	64
3.5 Conclusiones.....	67
Capítulo 4.....	69
4.1 Discusión General:.....	70
4.2 Avances logrados en el conocimiento.....	75
4.2.1 Sobre los efectos de los fitocromos en distintos niveles de organización:.....	75
4.2.2 Sobre los determinantes eco-fisiológicos de la producción de biomasa y el rendimiento a nivel de cultivo y la competencia intra-específica:.....	75

4.3 Aplicaciones futuras:	76
4.5 Implicancias futuras:	77
Capítulo 5.....	79
Bibliografía:	80

Índice de figuras:

Figura 2.1. Esquema de una poli-cultura ejemplificando la disposición de cada genotipo en la hilera (Wild type, *WT*, mutantes de fitocromos B1y B2, *phyB1* y *phyB2*, respectivamente). En la baja densidad de siembra, la distancia entre plantas en la hilera fue 30 cm y en alta densidad de 10 cm (ver flecha en la figura).....19

Figura 2.2. Plántula de la línea endo-criada Wild Type (*WT*) en V1, luego del raleo. Se puede observar el marcador plástico sobresaliendo de la superficie del suelo.....20

Figure 2.3. Evolución de la biomasa de las plantas de maíz de la línea endo-criada France 2 (*WT*) y sus líneas mutantes de fitocromos B (*phyB1* y *phyB2*) cultivadas en dos densidades de siembra contrastantes (círculos negros: baja densidad, los círculos blancos: de alta densidad) en Exp1 (A) y Exp2 (B). Las barras representan el error estándar de las medias. Las letras indican diferencias significativas ($p < 0,1$ y 0.001 en Exp1 y Exp2, respectivamente) de la biomasa vegetal en R6 entre densidades de siembra x genotipos (test de Tukey).....25

Figura 2.4. Tasa de crecimiento por planta alrededor de R1 (± 15 días alrededor de la floración femenina) de la línea endo-criada de maíz France 2 (*WT*) y sus líneas mutantes de fitocromos B (*phyB1* y *phyB2*) cultivadas en dos densidades de siembra contrastantes (columnas rayadas: baja densidad, columnas blancas: alta densidad) en Exp1 (A) y Exp2 (B). Las barras representan el error estándar de las medias. Las letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre densidades de siembra x genotipos (test de Tukey).....26

Figura 2.5. Evolución de la altura de las plantas (A y B) y el diámetro de la base de los tallos (C y D) de la línea endo-criada de maíz France 2 (*WT*) y sus correspondientes mutantes (*phyB1* y *phyB2*) cultivadas en dos densidades de siembra contrastantes (círculos negros: baja densidad, círculos blancos: alta densidad) en los Exp1 (A y C) y Exp2 (B y D). Las barras representan el error estándar de las medias. En A, D y E las letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los genotipos en el valor medio (promedio de dos densidades) de cada rasgo. En la C, las letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre densidades de siembra x genotipos (test Tuckey).....28

Figura 2.6. Tamaño promedio de las hojas (A y B), número total de hojas (C y D) y área foliar por planta (E y F) de la línea endo-criada de maíz France 2 (*WT*) y sus líneas mutantes de fitocromos B (*phyB1* y *phyB2*) cultivadas en dos densidades de siembra contrastantes (columnas rayadas: baja densidad, columnas blancas: alta densidad) en el Exp1 (A, C y E) y en el Exp2 (B, D y F). Las barras representan el error estándar de las medias. Las letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$; test de Tuckey) entre los valores medios de los genotipos (A, C, D, E, F) y entre densidades de siembra x genotipos (B).....29

Figura 2.7. Número total de células (A y D) en un área estandarizada ($60.000 \mu m^2$), longitud de células (B y E) y ancho de células (C y F) de la cara adaxial (A, B y C) y abaxial de la hoja (D, E y F) de la línea endo-criada de maíz France 2 (*WT*) y sus líneas mutantes de fitocromos B (*phyB1* y *phyB2*) cultivadas en dos densidades de siembra contrastantes (columnas rayadas: baja densidad, columnas blancas: de alta densidad de siembra). Las letras indican diferencias entre

las densidades de siembra (A, D, E, F) o entre densidades de siembra x genotipos (B, C) ($p < 0,05$; test de Tuckey).....30

Figura 2.8. Fotografías de secciones transversales (A, B, C), epidermis adaxial (D, E, F) y epidermis abaxial (G, H, I) de la hoja de la espiga apical de la línea endo-criada de maíz France 2 (A, D, G) y sus líneas mutantes de fitocromos B: *phyB1* (B, E, H) y *phyB2* (C, F, I) en baja densidad de siembra en el Exp2. e: estomas; c: células buliformes. Las barras de escala representan: A-C = 50 μm y D-I = 20 μm31

Figura 2.9. Fotografías de secciones transversales (A, B, C), epidermis adaxial (D, E, F) y epidermis abaxial (G, H, I) de la hoja de la espiga apical de la línea endo-criada de maíz France 2 (A, D, G) y sus líneas mutantes de fitocromos B: *phyB1* (B, E, H) y *phyB2* (C, F, I) en alta densidad de siembra en el Exp2. e: estomas; c: células buliformes. Las barras de escala representan: A-C = 50 μm y D-I = 20 μm32

Figura 2.10. Distribución azimutal de las hojas de la línea endo-criada France 2 (WT; A, D) y sus mutantes de fitocromo B (*phyB1*; B, E y *phyB2*; C, F) cultivadas en dos densidades de siembra contrastantes (cuadrados negros y líneas sólidas: baja densidad, círculos blancos y líneas de puntos: alta densidad) en el Exp1 (A, B, C) y Exp2 (D, E, F). Los *, ** indican el grado de significancia ($p < 0,05$ y $p < 0,01$; respectivamente) de la prueba χ^2 para la comparación en la distribución de hojas entre densidades de siembra. Las línea 1 y 9 corresponde a la dirección de la hilera de siembra. Los números alrededor del círculo indican los dieciséis sectores de 22,5°. Cada punto representa la proporción de hojas en cada sector de 30 plantas.....33

Figura 2.11. Calidad de la luz (relación R/RL) alrededor de la base de los tallos de la línea endo-criada de maíz France 2 (WT; A) y sus mutantes de fitocromos B (*phyB1*; B y *phyB2*; C) cultivadas en dos densidades de siembra contrastantes (columnas rayadas: baja densidad, columnas blancas: alta densidad) durante el Exp2. Las mediciones se realizaron en R1, con la superficie sensible del sensor frente a los cuatro puntos cardinales. Los valores del Norte representan R/RL reflejada por cada planta hacia el entresurco. Valores al sur representan R/RL reflejada por las plantas de la hilera opuesta. La R/RL en el Este y el Oeste caracterizan la calidad de la luz entre las hileras. Las barras representan el error estándar de las medias. Las letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre densidades para cada punto cardinal (test de Tukey).....34

Figura 2.12. Máxima fracción de intercepción de la radiación fotosintéticamente activa (fIRFA máxima) en la floración femenina de la línea de maíz endo-criada France 2 (WT) y sus mutantes de fitocromos B (*phyB1* y *phyB2*) cultivadas en dos densidades de siembra contrastantes (columnas rayadas: baja densidad, columnas blancas: alta densidad) en el Exp1 (A) y el Exp2 (B). Las barras representan el error estándar de las medias. Las letras indican diferencias significativas ($p < 0,001$) entre las densidades (prueba de Tukey).....34

Figura 2.13. Tasa de crecimiento de los cultivos alrededor (± 15 días) de la floración femenina de la línea endo-criada de maíz France 2 (WT) y sus líneas mutantes de los fitocromos B (*phyB1* y *phyB2*) cultivadas en dos densidades de siembra contrastantes (columnas rayadas: baja densidad, columnas blancas: alta densidad) en el Exp1 (A) y el Exp2 (B). Las barras representan el error estándar de las medias. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas (p

<0,05) entre los genotipos (media de dos densidades de siembra; A y B) o entre los tratamientos (densidad de siembra x genotipos; B) (test de Tukey y LSD Fisher, respectivamente).....35

Figura 2.14. Relación entre el crecimiento de los cultivos (biomasa acumulada) y la captura de radiación (IRFA acumulada) alrededor de la floración femenina de la línea de maíz endo-criada France 2 (*WT*) y sus mutantes de los fitocromos B (*phyB1* y *phyB2*), cultivadas en dos densidades de siembra contrastantes (símbolos negros: baja densidad, símbolos blancos: alta densidad) en el Exp2.....36

Figura 2.15. Biomasa de los cultivos a madurez fisiológica en la línea endo-criada France 2 (*WT*) y sus mutantes de los fitocromos B (*phyB1* y *phyB2*) cultivadas en dos densidad de siembra contrastantes (columnas rayadas: baja densidad, columnas blancas: alta densidad) en el Exp1 (A) y el Exp2 (B). Las barras representan el error estándar de las medias. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre genotipos (A y B). Letras minúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre densidades de siembra x genotipos (B) (prueba de Tukey).....37

Figure 2.16. Rendimiento de grano de la línea endo-criada France 2 (*WT*) y sus mutantes de los fitocromos B (*phyB1* y *phyB2*) cultivadas en dos densidades de siembra contrastantes (columnas rayadas: baja densidad, columnas blancas: alta densidad) en el Exp1 (A) y el Exp2 (B). Las barras representan el error estándar de las medias. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre genotipos. Letras minúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las densidades de siembra x genotipos (A) (test de Tukey).....38

Figura 3.1. Evolución temporal del CV de la biomasa de las plantas en mono-culturas de *WT*, A) y D); *phyB1*, B) y E) y *phyB2* C) y F) durante las campañas 2009-10 (Exp1.) y 2011-12 (Exp2). Círculos negros indican mono-culturas en baja densidad de siembra (9 pl.m^{-2}) y círculos blancos, mono-culturas en alta densidad de siembra (30 pl.m^{-2}). Las barras indican el error estándar entre repeticiones y los * las diferencias significativas (*, $p < 0.05$ test de Tukey) entre densidades para cada fecha de medición. Las flechas señalan el tiempo de floración femenina de cada mono-cultura.....51

Figura 3.2. Experimento 1, evolución de la biomasa de las plantas de la línea endo-criada France 2 en su versión *WT* (círculos negros), *phyB1* (círculos blancos) y *phyB2* (círculos grises) creciendo en poli-culturas (*WT/phyB1*, *WT/phyB2*, *phyB1/phyB2* y *WT/phyB1/phyB2*) en baja (primer columna de gráficos) y alta densidad de siembra (segunda columna). Las barras en cada punto indican el error estándar, y los * el efecto simple de la densidad de siembra. Letras minúsculas permiten comparar los efectos simples del genotipo y las letras mayúsculas la interacción entre densidades y genotipos ($p < 0.05$, test de Tukey).....52

Figura 3.3. Experimento 2, evolución de la biomasa de las plantas de la línea endo-criada France 2 en su versión *WT* (círculos negros), *phyB1* (círculos blancos) y *phyB2* (círculos grises) creciendo en poli-culturas (*WT/phyB1*, *WT/phyB2*, *phyB1/phyB2* y *WT/phyB1/phyB2*) en baja (primer columna de gráficos) y alta densidad de siembra (segunda columna). Las barras en

cada punto incidan el error estándar, y los * el efecto simple de la densidad de siembra. Letras minúsculas permiten comparar los efectos simples del genotipo y las letras mayúsculas la interacción entre densidades y genotipos ($p < 0.05$, test de Tukey).....43

Figura 3.4. Experimento 1; tasa de crecimiento de las plantas durante el período crítico (± 15 días a floración) de la línea endo-criada France 2, (WT, columnas negras) y sus respectivos mutantes de fitocromo B, *phyB1* (columnas blancas) y *phyB2* (columnas grises) creciendo en poli-culturas (WT/*phyB1*, WT/*phyB2*, *phyB1/phyB2* y WT/*phyB1/phyB2*) en baja (primer columna de gráficos) y alta densidad de siembra (segunda columna). Las barras en cada columna incidan el error estándar, los * el efecto simple de la densidad de siembra y las letras minúsculas el efecto simple del genotipo.....44

Figura 3.5. Experimento 2; tasa de crecimiento de las plantas durante el período crítico (± 15 días a floración) de la línea endo-criada France 2, (WT, columnas negras) y sus respectivos mutantes de fitocromo B, *phyB1* (columnas blancas) y *phyB2* (columnas grises) creciendo en poli-culturas (WT/*phyB1*, WT/*phyB2*, *phyB1/phyB2* y WT/*phyB1/phyB2*) en baja (primer columna de gráficos) y alta densidad de siembra (segunda columna). Las barras en cada columna incidan el error estándar, los * el efecto simple de la densidad de siembra y las letras minúsculas el efecto simple del genotipo.....59

Figura 3.6. Rendimiento (g m^{-2}) para las mono-culturas (WT, *phyB1*, *phyB2*) y poli-culturas (WT/*phyB1*, WT/*phyB2*, *phyB1/phyB2* y WT/*phyB1/phyB2*) en las campañas 2009-10 (Exp. 1) y 2011-12 (Exp.2) creciendo en baja (columnas rayadas) y alta densidad de siembra (columnas blancas). Las barras en cada columna indican el error estándar de las medias, las letras minúsculas el efecto simple de la cultura (C) y las mayúsculas el efecto de la interacción entre la cultura y la densidad de siembra (D) (Test LSD Fisher 5%). Se adjunta la significancia de cada factor y de la interacción entre factores.....60

Figura 3.7: Rendimiento (g m^{-2}) de las poli-culturas (WT/*phyB1*, WT/*phyB2*, *phyB1/phyB2* y WT/*phyB1/phyB2*) de la línea endo-criada France 2, (WT, columnas negras) y sus respectivos mutantes de fitocromo B (*phyB1*, columnas blancas y *phyB2*, columnas grises) en baja (columnas de la izquierda) y alta densidad de siembra (columnas de la derecha) para las campañas 2009-10 (Exp.1) y 2011-12 (Exp.2). Barras en cada columna indican error estándar. Letras minúsculas indican, efecto simple del genotipo (G) y mayúsculas la interacción entre la densidad de siembra (D) y el genotipo. Sobre cada columna se indica el LER de cada poli-cultura.....61

Figura 3.8. Rendimientos relativos de los genotipos WT, *phyB1* y *phyB2* en las poli-culturas WT/*phyB1* (O), WT/*phyB2* (Δ) y *phyB1/phyB2* (\diamond), en baja (primera columna) y alta (segunda columna) densidad de siembra para las campañas 2009-10 (símbolos blancos) y 2011-12 (símbolos grises). Para las poli-culturas WT/*phyB1* y WT/*phyB2*, WT se graficó en el eje Y y para las poli-culturas *phyB1/phyB2*, *phyB2* en el eje Y y *phyB1* en el X.....66

Índice de tablas:

<u>Tabla 2.1.</u> Parámetros del modelo alométrico utilizado para estimar la biomasa vegetativa durante V3-R3 y la biomasa de la espiga (R_1 - R_3).....	21
<u>Tabla 2.2.</u> Diferencias (porcentuales) de la biomasa de las plantas en R6 entre la baja y la alta densidad de siembra para la línea endo-criada de maíz France 2 (<i>WT</i>) y sus líneas mutantes de fitocromos B (<i>phyB1</i> y <i>phyB2</i>) en dos experimentos (Exp.).....	25
<u>Tabla 2.3.</u> Diferencias (porcentuales) entre la baja y la alta densidad de siembra, en la altura de las plantas y el diámetro de los tallos en R1 para la línea endo-criada de maíz France 2 (<i>WT</i>) y sus líneas mutantes de fitocromos B (<i>phyB1</i> y <i>phyB2</i>) en dos experimentos.....	27
<u>Tabla 2.4.</u> Estimación de la EUR a través de la pendiente de la función lineal ajustada a la relación entre la biomasa de los cultivos y la IRFA acumulada alrededor de floración (Fig. 2.14) para la línea endo-criada de maíz France 2 (<i>WT</i>) y sus mutantes de los fitocromos B (<i>phyB1</i> y <i>phyB2</i>) cultivadas en dos densidades de siembra contrastantes en el Exp2. Las comparaciones de la EUR entre densidades se realizaron mediante test de pendientes.....	34
<u>Tabla 3.1. A.</u> Área foliar por planta (cm^{-2}) y altura de tallos (cm) en floración para la línea France 2 (<i>WT</i>) y sus respectivos mutantes de fitocromo B, (<i>phyB1</i> y <i>phyB2</i>) cultivados en policulturas (<i>WT/phyB1</i> , <i>WT/phyB2</i> , <i>phyB1/phyB2</i> y <i>WT/phyB1/phyB2</i>) en baja y alta densidad de siembra en la campaña 2009/10 (Experimento 1). El <i>p-valor</i> , indica diferencias significativas del efecto simple del genotipo dentro de cada poli-cultura.....	55
<u>Tabla 3.1.B.</u> Área foliar por planta (cm^{-2}) y altura de tallos (cm) en floración para la línea France 2 (<i>WT</i>) y sus respectivos mutantes de fitocromo B, (<i>phyB1</i> y <i>phyB2</i>) cultivados en policulturas (<i>WT/phyB1</i> , <i>WT/phyB2</i> , <i>phyB1/phyB2</i> y <i>WT/phyB1/phyB2</i>) en baja y alta densidad de siembra en la campaña 2011/12 (experimento 2). El <i>p-valor</i> , indica diferencias significativas del efecto simple del genotipo dentro de cada poli-cultura.....	56

Abreviaturas utilizadas:

Abreviatura	Significado:
c	Células buliformes
CV	Coeficiente de Variación
DS	Desvío Estandar
e	Estomas
EUR	Eficiencia en el Uso de la Radiación
Exp.	Experimento
fIRFA	fracción de la Radiación Fotosintéticamente Activa Interceptada
IRFA	Radiación fotosintéticamente Activa Interceptada
N	Nitrógeno
Pfr	(del inglés) Phytochrome far red
phy...	Fitocromo Activo (proteína)
Phy...	Gene que codifica para el fitocromo activo PHY
<i>phy...</i>	Mutante del gene Phy que codifica para el fitocromo activo PHY
PIFs	(del inglés) Phytochrome Interaction Factors
Pr	(del inglés) Phytochrome red
Pfr	(del inglés) Phytochrome far red
R	Rojo
RL	Rojo Lejano
R/RL	Relación Rojo/Rojo Lejano
RFA	Radiación Fotosintéticamente Activa
TRFA	Radiación Fotosintéticamente Activa Transmitida
Vn	Nº de hojas Liguladas del cultivo
WT	(del inglés) Wild Type

ROL DE LOS FITOCROMO B1 Y B2 EN LOS RASGOS ARQUITECTURALES Y EN LA HABILIDAD COMPETITIVA DE LAS PLANTAS DE MAÍZ (*Zea mays* L.) ANTE CAMBIOS EN LA DENSIDAD DE SIEMBRA.

Resumen:

Las plantas de maíz (*Zea mays* L.) perciben la presencia de individuos a través de cambios en la calidad de luz del ambiente (cambios del R/RL) en el que crecen y desencadenan respuestas foto-morfogénicas a fin de reducir el sombreado mutuo. Los fitocromos B1 y B2 estarían involucrados en estas respuestas. Por otro lado los sistemas de producción del cultivo de maíz en alta densidad de siembra promueven desde etapas tempranas cambios en el crecimiento de las plantas (i.e. distinta habilidad competitiva de los individuos), que podrían estar relacionados con su mayor o menor reactividad en percibir vecinos. Se realizaron dos experimentos a campo con una línea de maíz con fitocromos activos (*WT*) y sus iso-líneas con mutaciones en los fitocromos B1 y B2, en dos densidades de siembra (9 y 30pl m⁻², i.e. variación en R/RL). Los objetivos fueron evaluar i) los determinantes del crecimiento de las plantas y del cultivo, ii) el rol de los fitocromos B en las variables medidas, iii) la variabilidad poblacional del crecimiento y iv) la habilidad competitiva de cada línea en poli-culturas (*WT/phyB1*, *WT/phyB2*, *phyB1/phyB2* y *WT/phyB1/phyB2*). La línea *phyB1* presentó menor altura y diámetro de tallos, menor área foliar y distribución aleatoria de hojas que la *WT*. La línea *phyB2* sólo presentó menor área foliar. El crecimiento de los cultivos, la producción de biomasa y el rendimiento de grano, sin embargo, se vió afectado por ambas mutaciones de fitocromo B, con una penalidad mayor en *phyB1* y con un mayor rendimiento de *phyB2* en alta densidad de siembra por una mayor fertilidad de las espigas. Por último, ambas mutaciones redujeron la variabilidad poblacional del cultivo y confirieron a las plantas una menor habilidad competitiva en poli-culturas aunque esto no representó una penalidad en el rendimiento del lote por una mayor fijación de granos en la *WT*.

Palabras claves: *Zea mays* L., Maíz, fitocromos B, calidad de luz, R/RL, rasgos arquitecturales, crecimiento, rendimiento, variabilidad poblacional, habilidad competitiva.

ROLE OF BPHYTOCHROMES IN ARCHITECTURAL TRAITS AND COMPETITIVE ABILITY OF MAIZE (*Zea mays*, L.) PLANTS AT CONTRASTING POPULATION DENSITIES

Abstract:

Maize plants (*Zea mays* L.) perceive the presence of individuals through early changes in light quality (changes in R/FR) of the environment and trigger photo-morphogenic responses to reduce mutual shading. B1 and B2 phytochromes are involved in these responses. On the other hand under current cropping systems (maize crops cultivated at high population densities), early changes of plant growth are promoted (i.e. distinct competitive ability of the individuals), which could be related to the degree of reactivity of plants to perceive neighbors. Two field experiments were conducted with the France 2 maize line with active B phytochromes (WT) and its iso-lines with mutations in the B1 and B2 phytochrome, cultivated at two densities (9 and 30 pl.m⁻², i.e. low and high of R/FR; respectively). The objective were to analyze i) plant growth and crop production, ii) the role of B Phytochromes on measured variables at the organ, plant and canopy level, iii) inter-plant variability of plant growth and iv) the competitive ability of each line in poly-cultures (WT/phyB1, WT/phyB2, phyB1/phyB2 and WT/phyB1/phyB2). Plants of phyB1 line were shorter and thinner than those of the WT and also exhibited a smaller leaf area and a random leaf area distribution. The line phyB2 only had lower leaf area than the WT. Crop growth and biomass production were affected by both mutations, but grain yield was only reduced by the mutation of B1 phytochrome. Contrastingly, crops of phyB2 attained a higher grain yield than the WT, especially at high planting density for the higher plant fertility of the former. Finally, at both tested densities monocultures of the mutation lines exhibited a lower inter-plant variability than those of the WT. Under poly-cultures, plants of both mutants had a lower competitive ability than those of the WT, although grain yield of the culture was not affected because the higher kernel set of WT.

Key words: *Zea mays* L., Maize, B phytochromes, light quality, R/FR, architectural traits, growth, grain yield, population variability, competitive ability.

Capítulo 1

Introducción General

1.1- Introducción

1.1.1 El cultivo de maíz y su sistema de producción

La producción del cultivo de maíz (*Zea mays*, L) en las regiones templado húmedas de Argentina, se basa en el empleo de híbridos simples cultivados en fechas de siembra tempranas o tardías que evitan la incidencia de deficiencias hídricas en los períodos críticos de los cultivos (Maddonni, 2012). En estos escenarios productivos, el rendimiento final del lote está altamente correlacionado con la captura total de radiación, la eficiencia en transformar la radiación en biomasa (i.e. eficiencia en el uso de la radiación; EUR) y la partición de la biomasa hacia los órganos cosechables (Boote and Loomis, 1991; Andrade, 1995; Otegui et al., 1995; Sarlangue et al., 2007). A lo largo del ciclo ontogénico, la captura de radiación depende de dos componentes, la especie (y su plasticidad vegetativa) y la disposición de las plantas en el espacio a través de la combinación entre la densidad de siembra objetivo y el distanciamiento entre hileras (Williams et al. 1968; Tetio-Kagho y Gardner, 1988a; Maddonni et al., 2001). En especies como el maíz, con baja plasticidad vegetativa (Kruk y Satorre, 2003), cuando las densidades de siembra son bajas, el crecimiento de cada uno de los individuos es máximo, ya que no hay competencia por los recursos pero el rendimiento del lote se encuentra limitado por la cantidad de plantas (Hashemi et al., 2005). Sin embargo, a medida que aumenta la población de plantas y con ella la competencia, el rendimiento de cada planta disminuye y el del lote se incrementa hasta una cierta densidad por encima de la cual la caída en el rendimiento de cada planta no es compensada por el aumento en la cantidad de plantas (Hashemi et al., 2005; Sarlangue et al., 2007; Deng et al., 2012). En estas densidades de siembra supra-óptimas, se manifiesta una fuerte jerarquización de plantas (Edmeades y Daynard, 1979; Maddonni y Otegui, 2004; 2006). En éste contexto, las plantas más hábiles competidoras (dominantes) alcanzan mayores tasas de crecimiento alrededor de floración que las más suprimidas del stand (dominadas), logrando una mayor fijación de granos (Maddonni y Otegui, 2004; Pagano y Maddonni, 2007; Rossini et al., 2011) pudiendo repercutir negativamente en el rendimiento del lote (Tollenaar y Wu, 1999).

1.1.2 El ambiente lumínico en el canopeo

Después de la emergencia del cultivo (estado Ve de la escala de Ritchie et al., 1993) y hasta el estado V3, las plántulas de maíz raramente se sombrean y el crecimiento depende de su estado de heterotrofia (Pommel, 1990). Durante esta etapa la radiación solar incide mayoritariamente sobre el suelo y una menor proporción es interceptada por las plántulas. Sin embargo a medida que avanza el crecimiento del cultivo, se incrementa el ritmo de aparición de hojas y el tamaño de las láminas aumentando la proporción de la radiación solar que es

interceptada por el área foliar (Maddonni y Otegui, 1996; Maddonni et al., 2001). Del total de la radiación solar, sólo el rango ubicado entre los 400-700 nm (aproximadamente el 45% del total) es utilizado por las plantas para el proceso fotosintético (Monteith, 1965) (i.e. radiación fotosintéticamente activa; RFA). En este rango, existen dos picos de mayor absorción centrados en los 400 nm (azul; A) y 700 nm (rojo; R). La radiación incidente contiene proporciones aproximadamente iguales de R y Rojo Lejano (700-800 nm; RL) ($R/RL \approx 1,1$) pero en un canopeo cerrado, la absorción diferencial por los pigmentos fotosintéticos produce cambios en esta relación (Sattin et al., 1994; Smith, 2000; Maddonni et al., 2001). Por consiguiente, a medida que la luz penetra en el canopeo, el R es absorbido, el RL es transmitido y reflejado y la relación R/RL se reduce (Holmes y Smith, 1977). Esta modificación del espectro de luz por una cubierta vegetal varía en la dimensión vertical (estratificación del canopeo), horizontal (espaciamiento entre hileras y densidad de plantas) y temporal (ontogenia del cultivo) y es percibida por las plantas, proporcionando una señal temprana de la presencia de vecinos previa a la competencia por luz, es decir al estrés lumínico (Ballare et al., 1987, 1997).

1.1.3 Fotorreceptores y respuestas foto-morfogénicas a nivel de planta y de cultivo

Los cambios de luz en el ambiente de un canopeo son percibidos por diferentes fotorreceptores: fitocromos, criptocromos y fotorreceptores UV-B (Casal et al., 1998; Casal, 2013). Estos tres grupos de foto-receptores operan independientemente y en conjunto con otros para regular el desarrollo y crecimiento de las plantas (Smith, 2000). Particularmente, en monocotiledóneas existen tres tipos de fitocromos : A, B y C (Mathews y Sharrock, 1997) y en maíz, los genes que codifican a estas proteínas están duplicados, es decir, A1 , A2 , B1 , B2, C1 y C2 (Christensen y Quail, 1989; Sheehan et al., 2004). Sheehan et al. (2007) explican que ésta duplicación se debió por un evento de alo-tetraploidización que ocurrió hace 11 millones de años en una estirpe de maíz, resultando en un segmento más largo de duplicación en el genoma de los maíces actuales.

Los fitocromos B1 y B2 son estimulados por una baja densidad de flujo de fotones (es decir, respuesta de baja fluencia) donde la luz R es absorbida por la forma inactiva del cromóforo (Pr sigla del inglés Phytochrome, red) transformándolo a la forma activa (Pfr sigla del inglés Phytochrome, far red), el cual al absorber la luz RL revierte este proceso (Casal et al., 1998; Smith, 2000). En el modelo propuesto hasta el momento, la forma Pfr viaja desde el citosol al núcleo donde interactúa físicamente con los PIFs (sigla del inglés phytochromes-interacting factors) a través de una secuencia N-terminal (Casal, 2013). Por otro lado, se ha

postulado que las respuestas rápidas de los Pfr operan a través del balance iónico del citoplasma celular (Smith, 2000). Teniendo en cuenta la primer vía de acción (transcripcional), en una situación de alta radiación (baja densidad de plantas) altas proporciones del fitocromo B estarán en su forma Pfr inhibiendo las respuestas descritas en el "síndrome de evasión de sombra" (Ballare et al., 1987; Casal, 2012). Si mutaciones en los fitocromos B inducen una pérdida de su función, la vía de señalización río abajo estaría inactiva.

En cereales como el sorgo (*Sorghum bicolor*) y la cebada (*Hordeum vulgare*), los fitocromos B toman protagonismo en el control de las respuestas de distintos rasgos de interés agronómico (e.g. elongación del mesocótilo, des-etiolización de plántula) que modulan la emergencia y posterior generación del stand de plantas (Childs et al., 1997; Hanumappa et al., 1999). En plántulas de arroz (*Oryza sativa*), la inhibición del coleoptile bajo luz R, se encuentra mediada por el PHYB en interacción con el PHYA y la inclinación del ángulo de la lámina foliar inducida por luz azul (percepción a través de criptocromos) es regulada antagónicamente por el PHYB (Takano et al., 2005). En plantas adultas de esta misma especie, se ha documentado que phyB1 y phyB2 se encuentran involucrados en control de la expansión de las hojas y la densidad estomática. Líneas de arroz con mutaciones en genes que codifican para estos fotoreceptores redujeron su área foliar y sus tejidos epidérmicos mostraron un menor número de células pero de mayor tamaño que los fenotipos silvestres (*WT* del inglés), y un menor número de estomas (Liu et al., 2012).

Utilizando una línea pura de maíz y con la obtención de mutantes simples y dobles de fitocromos B, Sheehan et al. (2007) encontraron que los genes PhyB1 y PhyB2 codifican proteínas con funciones solapadas y no redundantes que controlan respuestas en plántulas y plantas adultas. Por ejemplo, la inhibición del mesocótilo bajo luz R fue expresada por las plantas con PhyB1 activo, el tiempo a floración se determinó principalmente por PhyB2 activo, tanto PhyB1 como PhyB2 regulan el alargamiento de la vaina y del tallo de plantas maduras y la línea doble mutante (*phyB1-phyB2*) exhibió tallos más cortos y más delgados en baja densidad de siembra (es decir, respuestas constitutivas) que las demás líneas.

Por otro lado, en *Arabidopsis thaliana* la sobre expresión de PHYB aumentó la cantidad de Pfr activo promoviendo un incremento en la densidad de estomas, con el consecuente aumento de la fotosíntesis a expensas de una mayor transpiración (Boccalandro et al., 2009). En papa (*Solanum tuberosum*), la sobre expresión de PHYB mejoró el rendimiento de tubérculos ya que aumentó la fotosíntesis de todos los estratos del canopeo (Boccalandro et al., 2003).

En maíz, desde estados ontogénicos tempranos las plantas de un canopeo reaccionan a la presencia de sus vecinas modificando su arquitectura (e.g., reduciendo el macollaje,

elongando los tallos, afinando las láminas y re-orientando las hojas) para reducir la interferencia por luz (Kasperbauer y Karlen, 1994; Maddonni et al., 2001). Estas respuestas han sido asociadas a la reflexión de baja relación R/RL (elongación de tallos, afinamiento de láminas y re-orientación de hojas) y bajo R/RL y bajo A (macollaje) (Kasperbauer y Karlen, 1994; Maddonni et al., 2002). Se ha especulado que al menos el primer grupo de respuestas estarían mediadas por fitocromos B (Maddonni et al., 2001, 2002; Maddonni y Otegui, 2004) pero no han sido puestas a prueba.

Estos hallazgos ponen de manifiesto el protagonismo de los fitocromos B en la habilidad competitiva de cada planta de una comunidad en percibir individuos vecinos de igual o distinta especie, a través de cambios en su arquitectura (i.e. respuestas foto-morfogénicas) que impactan en su crecimiento dentro del canopeo. Sin embargo no existen estudios que hayan explorado el rol de los fitocromos B en la habilidad competitiva de las plantas en canopeos de maíz. Por otro lado, también resulta de interés agronómico, analizar de qué manera esa población de plantas intercepta radiación a nivel de cultivo (intercepción de radiación), como la utiliza para producir biomasa (EUR) y la particiona a los órganos de cosecha (i.e. rendimiento en grano del lote).

1.1.4 Variabilidad poblacional y habilidad competitiva de las plantas

Una planta que crece de forma aislada lo hará sin interferencias a lo largo de todo su ciclo. En condiciones de cultivo, en estadios iniciales la situación es similar ya que cada individuo crece sin interferencias; sin embargo, la disposición de las plantas de cultivos en hileras determina que a medida que avanza la ontogenia, se generen procesos de redistribución de recursos que son escasos para satisfacer la demanda de la población (Maddonni y Otegui, 2004). Es decir, se establecen procesos de competencia intra-específica primero entre los individuos de una misma hilera y posteriormente entre plantas de hileras contiguas.

Particularmente, la competencia por luz en una comunidad vegetal es asimétrica cuando no existen limitaciones de otros recursos como el agua y los nutrientes (Casper y Jackson, 1997; Berntson y Wayne, 2000). Esta asimetría se origina debido a que aquellas plantas de mayor crecimiento (i.e. individuos dominantes) ubican su área foliar por encima de las más pequeñas (i.e. individuos dominados). Como consecuencia, la captura de luz por unidad de área foliar es mayor en los individuos dominantes que en los dominados del stand, reflejándose en un incremento de la variabilidad poblacional del crecimiento de las plantas (Rossini et al., 2011). Al incrementarse la densidad de siembra, se incrementa la competencia

asimétrica por luz y también la variabilidad poblacional del crecimiento de las plantas (Edmeades y Daynard, 1979; Maddonni y Otegui, 2004; Pagano et al., 2007) produciendo una penalidad en el rendimiento del lote (Andrade y Abbate, 2005; Tollenaar y Wu, 1998) y en consecuencia las plantas más suprimidas del stand pueden exhibir alrededor de floración tasas de crecimiento muy cercanas al umbral de esterilidad, y su baja o nula fijación de granos puede no ser compensada por la mayor granazón de las plantas dominantes (Maddonni y Otegui, 2006; Pagano et al., 2007). Por lo tanto, para sostener el rendimiento del cultivo sería necesario reducir la variabilidad del crecimiento de las plantas especialmente alrededor de floración. En éste sentido plantas de maíz con mutaciones en los fitocromo B sin capacidad de desencadenar respuestas de evasión al sombreado reducirían la variabilidad poblacional y aumentarían los rendimientos del lote. Por otro lado se podría especular que estas plantas (sin capacidad de percibir vecinas) compitiendo con sus pares con fitocromos activos (i.e. en poli-culturas de *WT* y mutantes) serían menos hábiles competidoras quedando inhibidas en su crecimiento, aumentando la variabilidad poblacional y reduciendo el rendimiento del lote.

Para poder poner a prueba estas especulaciones, sería necesario diseñar un experimento compuesto por canopeos de mono-culturas de líneas *WT* y sus mutantes de los fitocromos B y poli-culturas de reemplazo (i.e. densidad fija con igual proporción de plantas *WT* y mutantes). Desde el año 2007 el grupo de maíz de la Cátedra de Cerealicultura de la FA-UBA cuenta con semillas de una línea de maíz (France 2) y de sus versiones con mutaciones del *PhyB1* (*phyB1*), del *PhyB2* (*phyB2*) y de la doble mutación (*phyB1-phyB2*). Las mismas (10 semillas por genotipo) fueron provistas por el Maize Genetics COOP Stock Center (<http://maizecoop.cropsci.uiuc.edu/>) y desde entonces se las ha multiplicado anualmente para lograr la cantidad necesaria para diseñar canopeos. Como se mencionó anteriormente existe información de los efectos de las mutaciones de PHYB1 y PHYB2 en la línea France 2 sobre diversos caracteres de plántulas y plantas adultas en casi condición de planta aislada (Sheehan et al., 2007). El uso de estas líneas en densidades de siembra contrastantes permitiría esclarecer, *en que rasgo arquitectural actúa cada fitocromo B, cómo esas respuestas determinarían el crecimiento individual de cada individuo y como se afectan las variables eco-fisiológicas determinantes del crecimiento del cultivo (i.e. intercepción de radiación, EUR)*. Más aún, si se evaluara el crecimiento de cada individuo en poli-culturas con densidades de siembra contrastantes sería posible esclarecer si los individuos con o sin fitocromos B activos presentan mayor o menor habilidad competitiva y por último sería posible encontrar relaciones funcionales como las descritas en otros sistemas de cultivos mixtos o inter-cultivos (Fukai, 1993; Monzon et al., 2014).

1.2-Objetivos

El objetivo general de esta tesis fue describir cómo los fitocromos B1 y B2 afectan el crecimiento individual de las plantas, el crecimiento del cultivo y las relaciones funcionales entre individuos del stand en densidades de siembra contrastantes (i.e. con variaciones en la cantidad y calidad de luz) en cultivos puros (mono-culturas) y mixtos (poli-culturas).

1.2.1 Objetivos particulares:

- i) Describir el crecimiento de las plantas a distintos niveles de organización (célula, órgano, individuo), y los rasgos arquitecturales involucrados en la captura de radiación en mono-culturas de una línea de maíz sin mutaciones (*WT*) y de las iso-líneas con mutaciones (*phyB1* y *phyB2*) en dos densidades de siembra contrastantes (baja y alta) sin limitaciones hídrico-nutricionales.
- ii) Asociar las variables detalladas en (i) con la presencia o ausencia de cada uno de los fitocromos B y sus respuestas al estímulo lumínico (variación de R/RL) generado por las densidades de siembra contrastantes. Posteriormente, interpretar de qué manera cada rasgo influye en las variables que determinan el crecimiento del cultivo, i.e. intercepción de radiación y EUR.
- iii) Estudiar la variabilidad poblacional (i.e. competencia intra-específica) a lo largo del ciclo en mono-culturas con plantas reactivas al “síndrome de evasión de sombra” (línea *WT*) y mono-culturas posiblemente menos reactivas (líneas *phyB1* y *phyB2*) en densidades de siembra contrastantes (i.e. con bajo y alto estrés lumínico).
- iv) Estudiar si el “síndrome de evasión de sombra” en condición de cultivo significa un beneficio o una penalidad en términos de crecimiento y rendimiento en grano a través de la descripción del crecimiento de plantas reactivas (*WT*) y menos reactivas (*phyB1* y *phyB2*) en poli-culturas sembradas en densidades de siembra contrastantes. Interpretar si existen relaciones funcionales entre ambos tipos de plantas (i.e. habilidad competitiva, complementariedad de recursos o relaciones negativas).

1.3-Hipótesis

- i. La ausencia de *PhyB1* o *PhyB2* en las plantas de una población de maíz, modificará las respuestas esperadas en los rasgos foto-morfogénicos del canopeo ante

incrementos en la densidad de siembra (i.e. variación en la relación R/RL). Particularmente las líneas *phyB1* o *phyB2*, presentarán fenotipos de alta densidad (evasión de sombra) en condiciones de alta relación R/RL; i.e. baja densidad de siembra.

- ii. Teniendo en cuenta que cada fitocromo estará ligado a distintos rasgos arquitecturales, alguna de las mutaciones producirán efectos diferenciales en el crecimiento de las plantas.
 - a. Esta variación en el crecimiento estaría dado por cambios en la captura de radiación (menor área foliar) y/o en la EUR.
 - b. Si existe tal variación en el crecimiento de la/s planta/s mutantes se producirán cambios en la eficiencia reproductiva, a través de variaciones en la tasa de crecimiento por planta alrededor del período crítico.
- iii. Las plantas sin fitocromos activos (líneas *phyB1* y *phyB2*) en mono-culturas, presentarán una menor variabilidad poblacional del crecimiento con respecto a las *WT*, especialmente en alta densidad de siembra.
- iv. En poli-culturas (i.e. parcelas de culturas mixtas; *WT/phyB1*, *WT/phyB2*, *phyB1/phyB2* y *WT/phyB1/phyB2*) el crecimiento diferencial de las *WT* y las líneas sin fitocromos B activos reflejará la diferente habilidad competitiva de los componentes de la mezcla, especialmente en alta densidad de siembra.

Capítulo 2

**Rol de los fitocromos B en el crecimiento de las plantas de maíz,
rasgos arquitecturales y determinantes eco-fisiológicos del
crecimiento del cultivo en densidades de siembra contrastantes**

2.1- Introducción

El desarrollo de un canopeo a lo largo del ciclo de un cultivo, genera cambios temporales tanto en la eficiencia de la captura de radiación como también en la cantidad y calidad de la luz (relación R/RL) percibida por las plantas (Maddonni et al., 2001; Sattin et al., 1994; Tetio-Kagho and Gardner, 1988a). Estas variaciones en la relación R/RL son percibidas por los fitocromos de las plantas proporcionando una señal temprana que antecede al estrés lumínico (Ballare et al., 1997; Maddonni et al., 2002). Así, en alta densidad de siembra, las plantas de maíz muestran varios cambios en su arquitectura, que permiten atenuar las interferencias entre las plantas de una misma hilera (Maddonni et al., 2001; Sangoi et al., 2002).

Las respuestas foto-morfológicas originadas por los fitocromos B en respuesta a la calidad de la luz (Casal, 2012; 2013) determinan variaciones en el crecimiento de las plantas de una comunidad. Si bien existe un importante volumen de información acerca de estas respuestas descritas en el “síndrome de evasión de sombra” en diversas especies (Boccalandro et al., 2003; Takano et al., 2005; Liu et al., 2012) su impacto a nivel de cultivo es escaso. Una manera de ponerlo a prueba es contar con iso-líneas *WT* y sus mutantes de los fitocromos B.

Las plantas de maíz con mutaciones nulas del PhyB1 (*phyB1*) y en PhyB2 (*phyB2*) aún en baja densidad de siembra podrían exhibir un fenotipo constitutivo de "planta sombreada" (hipótesis i), pudiendo comprometer el crecimiento del cultivo debido a una menor captura de radiación. Por otro lado, estas plantas podrían presentar cambios diferenciales en su arquitectura, en respuesta al estrés por luz (aumento de la densidad de siembra), si ambos fitocromos (PhyB1 y PhyB2) cumplieran las mismas funciones (hipótesis ii). Finalmente se desconoce cómo operan las mutaciones de los fitocromos B sobre la EUR y si existe una penalidad de la actividad de los fitocromos B sobre el rendimiento a nivel de cultivo.

En este capítulo se analizará los efectos de los fitocromos B de maíz sobre i) la respuesta del crecimiento de las plantas al estrés por luz generado por el incremento en la densidad de siembra a través de la descripción de varios rasgos arquitecturales, ii) la tasa de crecimiento del cultivo alrededor de floración y sus determinantes eco-fisiológicos, es decir, la eficiencia de captura de la radiación y la EUR, y iii) el rendimiento en grano (Objetivos específicos i y ii).

2.2 Materiales y métodos

2.2.1. Diseño experimental

Se condujeron dos experimentos en el campo experimental del Departamento de Producción Vegetal de la Universidad de Buenos Aires, Argentina (34 ° 25'S, 58 ° 25'W) sobre un suelo franco arcilloso limoso (Argiudol Vértico; Soil Taxonomy, EE.UU. Departamento de Agricultura). Los experimentos se sembraron el 15 de enero de 2009 (Exp1) y el 18 de noviembre 2011 (Exp2).

Los tratamientos (culturas) se dispusieron en un diseño de parcelas divididas con tres repeticiones, con la densidad de siembra como el factor principal (9 y 30 pl m⁻², baja y alta densidad de siembra, respectivamente) y la cultura como el sub-factor (es decir, sub-parcela, ver detalle en 2.2.2). Los genotipos utilizados fueron la línea de maíz France 2 (tipo silvestre; WT) y sus respectivos mutantes de PhyB1 (*phyB1*) y PhyB2 (*phyB2*) con igual base genética. Las semillas de estos genotipos fueron proporcionadas previamente por el Centro de Cooperación Genética del Maíz (<http://maizecoop.cropsci.uiuc.edu>) y se multiplicaron en Argentina durante 2008 y 2010 para obtener el número de semillas necesarias para cada Exp. Lamentablemente, la línea doble mutante (*phyB1-phyB2*) no se incluyó en los Exps., ya que produjo muy pocas semillas.

Cada sub-parcela involucró tres hileras de 3 m de largo, distanciadas a 0,40 m dispuestas con orientación este-oeste. Para asegurar una emergencia uniforme de las plántulas a lo largo de las hileras, se utilizaron cintas de papel adhesivo sobre las que se pegaron dos semillas por posición en los intervalos correspondientes a cada densidad de siembra (10 y 30 cm, para la alta y la baja densidad de siembra; respectivamente). Las semillas se adhirieron a las cintas con la cara del embrión del lado opuesto del adhesivo y con la piloriza apuntando hacia el suelo. Las cintas se colocaron a lo largo de las hileras con la parte adhesiva hacia el norte. En consecuencia, la primer hoja de cada plántula emergió hacia el norte y las sucesivas crecieron preferentemente perpendiculares a las hileras, lo que redujo la interferencia temprana entre las plantas (Toler et al., 1999). Después de la emergencia, se procedió al raleo de las plántulas dejando una planta por posición.

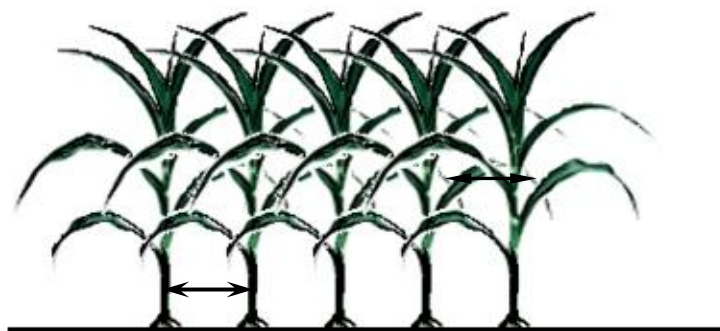
A partir de V3 se marcaron 10 plantas consecutivas sobre las hileras de cada sub-parcela para realizar las mediciones que se describe en 2.2.3. En primer término las etiquetas se colocaron entre la tercera y la cuarta hoja y en V10 se situaron por encima de la sexta hoja.

Los cultivos fueron regados por goteo a lo largo de todo el ciclo y la fertilización nitrogenada se aplicó en el estado de V4 (200 kg N ha⁻¹) para reducir al mínimo las restricciones de N. Todas las adversidades fito-sanitarias fueron controladas mecánica

(malezas) y químicamente (insectos y hongos). Los registros de radiación solar diaria y temperatura del aire fueron obtenidos con una estación meteorológica (Weather Monitor II, instrumentos Davis, EE.UU.) ubicada en el campo experimental.

2.2.2. Culturas

Para poner a prueba las Hipótesis de esta tesis, se diseñaron dos tipos de culturas (sub-parcela), las mono-culturas, constituidas por canopeos puros de genotipos *WT*, *phyB1* o *phyB2* (hipótesis i, ii y iii) y las poli-culturas (hipótesis iv) constituidas por canopeos con mezclas de reemplazo de los genotipos (i.e. la densidad total fue mantenida constante con igual proporción de cada componente). Para ello se pegaron las semillas de los genotipos en forma alternada a lo largo de las cintas de manera de lograr las siguientes combinaciones: *WT/phyB1*, *WT/phyB2*, *phyB1/phyB2* y *WT/phyB1/phyB2* (Figura 2.1). Para identificar cada genotipo, se añadieron además marcadores plásticos de colores al lado de cada semilla. Estos marcadores sobresalían sobre la superficie del suelo permitiendo identificar la ubicación de cada genotipo en la hilera (Figura 2.2).



Poli-cultura:

- *WT/phyB1*
- *WT/phyB2*
- *phyB1/phyB2*
- *WT/phyB1/phyB2*

Genotipos:

WT phyB1 WT phyB1 WT...
WT phyB2 WT phyB2 WT...
phyB1 phyB2 phyB1 phyB2 phyB1..
WT phyB1 phyB2 WT phyB1..

Figura 2.1. Esquema de una poli-cultura ejemplificando la disposición de cada genotipo en la hilera (Wild type, *WT*, mutantes de fitocromos B1y B2, *phyB1* y *phyB2*, respectivamente). En la baja densidad de siembra, la distancia entre plantas en la hilera fue 30 cm y en alta densidad de 10 cm (ver flecha en la figura).



Figura 2.2. Plántula de la línea endo-criada Wild Type (WT) en V1, luego del raleo. Se puede observar el marcador plástico sobresaliendo de la superficie del suelo.

2.2.3. Mediciones

2.2.3.1 Biomasa y crecimiento de las plantas

Semanalmente la biomasa de todas las plantas etiquetadas fue estimada entre V3 y el inicio del período de llenado efectivo de grano (R3; Ritchie et al., 1993) por medio de modelos alométricos utilizados ampliamente en esta especie (Maddonni and Otegui, 2004; Tollenaar et al., 2006; Pagano and Maddonni, 2007; Laserna et al., 2012). Brevemente se realizaron muestreos destructivos de plantas (10 plantas por genotipo) de parcelas anexas, en las mismas fechas de medición de las plantas marcadas, para estimar relaciones entre la morfo-metría de las plantas (altura del tallo desde el suelo hasta la inserción de la lígula de la última hoja expandida y el diámetro basal del tallo) y de la espiga apical (diámetro máximo, a partir de R1) y sus biomásas reales (en base de su peso seco). Desde V3 hasta R3 se ajustaron modelos lineales entre la biomasa de las plantas (biomasa total de la planta durante las etapas V y biomasa vegetativa en R1 y R3) y el volumen de un cilindro estimado con la altura y el diámetro basal del tallo de cada genotipo. Durante la floración femenina (R1) y en R3, la biomasa reproductiva (vainas + mazorca+ estigmas) se distinguió de la vegetativa (tallo + hojas + panoja) y se ajustó un modelo exponencial para la biomasa de las espigas a partir de su diámetro máximo. Los parámetros de los modelos vegetativo y reproductivo se detallan en la Tabla 2.1.

En cada fecha de muestreo, las variables morfo-métricas se registraron en las plantas marcadas de cada sub-parcela y los modelos alométricos establecidos se utilizaron para estimar su biomasa (es decir, la biomasa aérea total de las plantas durante las etapas V y la biomasa de las espigas apicales en R1 y R3). En R1 y R3 la biomasa total de las plantas se calculó como la suma de la biomasa vegetativa más la biomasa reproductiva.

Tabla 2.1. Parámetros del modelo alométrico utilizado para estimar la biomasa vegetativa durante V3-R3 y la biomasa de la espiga (R₁-R₃)*

Experimento	Genotipo	Etapa ontogénica							
		V ₃ -R ₃ (Biomasa vegetativa)			R ₁ -R ₃ (Biomasa de espiga)				
		<i>a</i>	<i>B</i>	R ²	<i>n</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	R ²	<i>n</i>
Exp ₁	<i>WT</i>	3.691	0.172	0.619	39	0.530	0.874	0.831	34
	<i>phyB1</i>	7.364	0.136	0.496	40	0.505	0.907	0.843	36
	<i>phyB2</i>	6.293	0.127	0.669	39	0.534	0.913	0.757	39
Exp ₂	<i>WT</i>	0.051	0.704	0.965	40	0.591	0.094	0.944	40
	<i>phyB1</i>	0.057	0.800	0.945	39	0.425	0.103	0.882	38
	<i>phyB2</i>	0.054	0.536	0.950	39	0.632	0.094	0.848	42

* Desde V₃-R₁, el modelo asociado para la *biomasa vegetativa* = $a + b \text{ Vol}$, basado en el volumen del tallo (Vol, cm³). Desde R₁-R₃, *biomasa de la espiga* = $c * e^{d * \text{diámetro de espiga}}$ fue el modelo para estimar la biomasa de la espiga, basado en el diámetro máximo de la espiga (diámetro de espiga, mm). El volumen del tallo fue calculado a partir de la fórmula del cilindro, utilizando la altura del tallo desde el nivel del suelo hasta la última hoja ligulada y el diámetro de la base del tallo (promedio entre el valor máximo y mínimo de la base del tallo).

En madurez fisiológica (R6) las plantas etiquetadas se muestrearon de forma individual, se secaron en estufa a 60 °C durante 72 h y posteriormente fueron pesadas. La evolución de la biomasa de las plantas a partir de V3 a R6, fue relacionada con el tiempo térmico (temperatura base 8 °C) después de la emergencia (Ritchie y NeSmith, 1991).

La tasa de crecimiento de las plantas alrededor de R1 se estimó a partir de la pendiente de la regresión ajustada a la biomasa total en V10, R1 y R3 y el tiempo después de la siembra (en días). Esta tasa de crecimiento se expresó en g pl⁻¹ d⁻¹ para compararlas con los valores reportados en estudios previos en líneas de maíz (por ejemplo, D'Andrea et al., 2006).

2.2.3.2. Área foliar, anatomía de las hojas y distribución azimutal de las hojas

El número de hojas liguladas se registró semanalmente en las plantas marcadas. Desde V5 a VT se midió la longitud (L) y el ancho máximo (AN) de cada hoja completamente expandida para estimar el área de la hoja (AF) como en Montgomery, (1911), ecuación (2.1).

$$AF = \alpha LAN$$

(2.1)

donde $\alpha = 0.75$ para un amplio rango de genotipos y densidades de siembra (Stewart and Dwyer, 1999).

En R3, el área foliar por planta se estimó mediante el cálculo como la suma de las superficies de las hojas verdes. Una hoja se consideró senescente cuando la mitad o más de su área presentaban síntomas de amarillamiento.

Para explorar el impacto de los fitocromos B y la densidad de siembra en la anatomía de las hojas (sólo en Exp2), en 3 plantas de cada sub-parcela de las mono-culturas se muestrearon hojas correspondientes a la espiga apical. Tres porciones de la parte central (ancho máximo de la hoja) de cada lámina se cortaron y diseccionaron para analizar las capas de células de las superficies adaxial y abaxial. Ambas capas se diafanizaron mediante el uso de la técnica de Dizeo de Strittmatter (1973) y se tiñeron con safranina-rápida verde (Johansen, 1940). Las secciones se fotografiaron con un microscopio óptico Zeiss Axioplan (Oberkochen, Alemania) y se analizaron con el software 5s Zeiss AxioCam ERc (Jena, Alemania). Se midieron el número de células totales, ancho y longitud de las células, y el número de estomas en un área estandarizada (30.000 μm^2) a partir de las imágenes obtenidas. Además, se realizaron cortes transversales para determinar el ancho de las hojas. Se cortaron porciones de hoja en rodajas finas (aprox. 10 a 15 μm de espesor) con un micrótopo rotatorio de tipo Mino que fueron embebidas en parafina. Estas muestras se tiñeron de la misma manera como se ha descrito anteriormente.

La distribución azimutal de las hojas (ubicación de las hojas en el plano horizontal) se midió en R3 mediante un círculo de plástico transparente ubicado por encima de cada hoja a lo largo del tallo de todas las plantas marcadas (Maddonni et al., 2000, 2001). El círculo plástico se divide en 16 sectores (22 ° 30 'por sector) y los sectores 16, 1, 8 y 9 se colocaron sobre la dirección de la hilera de siembra. Para cada hoja se registró, el número del sector donde se proyectó la parte media de la nervadura central. Estos datos permitieron calcular la frecuencia de hojas en cada sector.

2.2.3.3. Calidad de la luz, captura de luz, crecimiento y eficiencia en el uso de radiación

En el Exp2 se realizaron a R1 mediciones de la relación R/RL en la base de las plantas marcadas (3 plantas por sub-parcela) mediante un radiómetro de dos canales (Modelo SKR 110, de Skye Instrumentos, Powys, Reino Unido) con cabeza de coseno-correcto y filtros de banda estrecha centrado en 660 (R) y 730 nm (RL). El sensor estaba conectado a un medidor portátil de lectura instantánea directa. Las mediciones se realizaron entre las 1200 y 1300 h en un día sin nubosidad. El sensor se colocó frente a la base de las plantas (3-4cm) en el lado

norte de las hileras, con su superficie de detección perpendicular al suelo y hacia los cuatro puntos cardinales (N, S, E y O). Cuando la cara del sensor estaba apuntando al sur, la relación R/RL provenía de la planta más cercana. Por el contrario, los valores de R/RL de los otros puntos cardinales representaban la calidad de la luz en el entresurco.

La fracción de la RFA incidente (IRFA) interceptada por el canopeo (fIRFA) se midió en R1 en el Exp1 y semanalmente desde V10 a R3 en el Exp2. Los registros se obtuvieron al mediodía, en días sin nubosidad entre las 1130 y las 1300 h, usando un sensor cuántico lineal (Cavabar, Cavadevices, Argentina). En cada sub-parcela, la barra (1 m de longitud) del sensor se colocó por encima del canopeo para medir IRFA y entre las hojas verdes y las hojas senescentes para medir la RFA transmitida (TRFA). Se registraron tres mediciones de TRFA por sub-parcela cerca de las plantas marcadas, con la barra del sensor centrada entre dos plantas y dispuesta diagonalmente con el fin de abarcar dos entresurcos. La fIRFA se estimó según la ecuación 2.2.

$$fIRFA = 1 - (TRFA / IRFA) \quad (2.2)$$

En el Exp2, se obtuvieron valores diarios de fIRFA desde V10 a R3 por interpolación lineal y se aplicaron a los valores diarios de IRFA para estimar la IRFA interceptada alrededor de R1 (es decir, 30 días centrada en R1). En ambos Exp., los valores de biomasa vegetal en V10, R1 y R3, se multiplicaron por la correspondiente densidad de siembra para estimar la biomasa de los cultivos. La tasa de crecimiento de los cultivos alrededor de R1 se estimó a partir de la pendiente de la regresión lineal ajustada la biomasa de los cultivos en V10, R1 y R3 y el tiempo después de la siembra (en días). En el Exp2 se ajustó una regresión lineal a los valores de biomasa acumulada en el período alrededor de floración y la IRFA acumulada en el mismo período. La pendiente de la función ajustada se utilizó para estimar la EUR durante el período crítico (Kiniry et al., 1989).

2.2.3.4. Rendimiento en grano y sus componentes

El rendimiento de grano por unidad de superficie se estimó a partir del producto del rendimiento de grano promedio de plantas etiquetadas y la correspondiente densidad de siembra. Del mismo modo, el número de granos por unidad de superficie se estimó a partir del producto del número medio de granos de las plantas etiquetadas y la correspondiente densidad de siembra. En cada sub-parcela, la proporción de plantas fértiles se estimó a partir del cociente entre el número de plantas con más de 10 granos (Tollenaar et al., 1992) y el número total de plantas etiquetadas.

2.2.4. Análisis estadísticos

En cada Exp., las diferencias entre los tratamientos para todas las variables fueron analizadas mediante análisis de la varianza (ANOVA). Cuando se analizaron las mono-culturas y la densidad de siembra, el modelo utilizado fue en parcelas divididas, donde la densidad fue el factor principal y el sub-factor la mono-cultura. Se utilizó la prueba de Chi cuadrado (χ^2) para analizar las frecuencias de distribución de las hojas (frecuencia del ángulo azimutal). Para evaluar el efecto de los fitocromos B sobre este rasgo, la distribución azimutal de cada línea mutante se comparó con la del *WT* en la respectiva densidad de siembra (la distribución azimutal de *WT* fue considerada la distribución esperada). Para probar el efecto densidad de plantas en la distribución azimutal de las hojas, se comparó la distribución de cada genotipo en alta densidad de siembra respecto a la de la baja densidad. Se consideró a los efectos de los tratamientos sobre la distribución azimutal como significativos cuando el valor χ^2 estimado fue mayor que el valor de tabla con 15 grado de libertad y $p < 0,05$.

2.3. Resultados

En este capítulo sólo se presenta los resultados de las mono-culturas. Las mediciones efectuadas en las poli-culturas y su confrontación con los resultados de las mono-culturas se exhiben en el capítulo 3.

2.3.1. Biomasa de las plantas

En ambos Exp, se registró un efecto significativo de la densidad de siembra x el genotipo en la biomasa individual estimada de la plantas a partir de los 1250 °Cd (es decir desde R3) en adelante ($p < 0,10$ en Exp1 y $p < 0,01$ en Exp2; respectivamente). En alta densidad, la biomasa en R3 y R6 no difirió entre genotipos (Fig. 2.3 A, B). Por el contrario, en la menor densidad de siembra las *WT* alcanzaron una mayor biomasa que las dos líneas mutantes (en Exp2) o que la *phyB1* (en Exp1). En R6, las diferencias en este rasgo entre densidades de siembra (Tabla 2.2) resultaron mayores para la *WT* ($\approx 50\%$) que para las líneas mutantes ($\approx 32\%$).

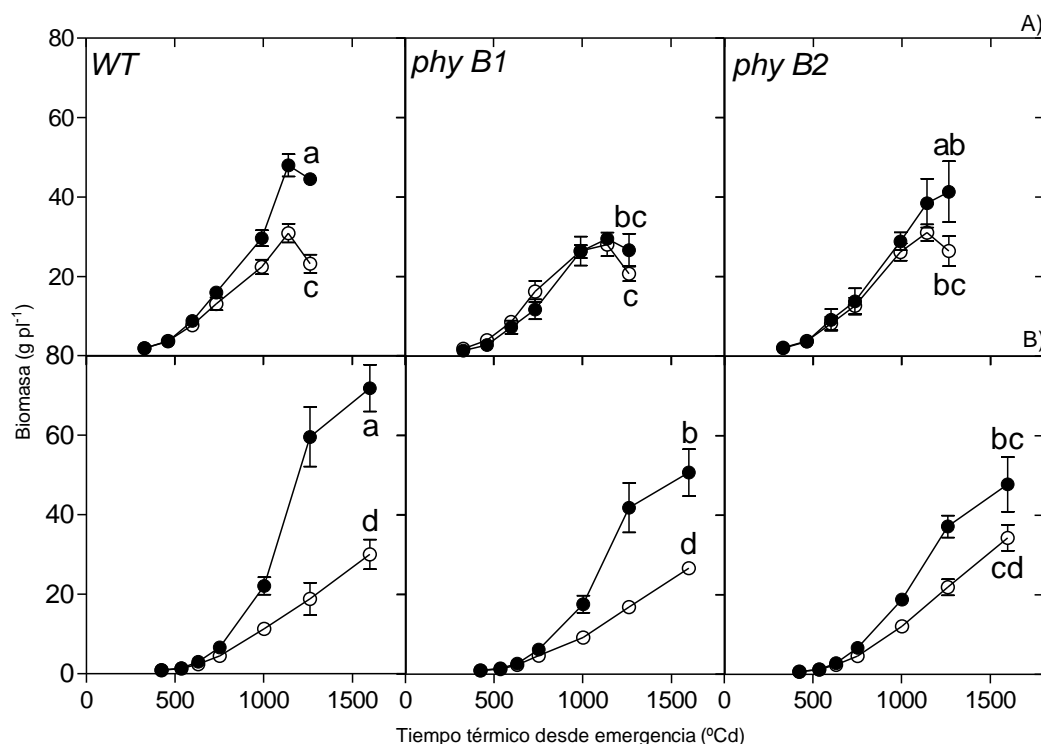


Figure 2.3. Evolución de la biomasa de las plantas de maíz de la línea endo-criada France 2 (*WT*) y sus líneas mutantes de fitocromos B (*phyB1* y *phyB2*) cultivadas en dos densidades de siembra contrastantes (círculos negros: baja densidad, los círculos blancos: alta densidad) en Exp1 (A) y Exp2 (B). Las barras representan el error estándar de las medias. Las letras indican diferencias significativas ($p < 0,1$ y 0.001 en Exp1 y Exp2, respectivamente) de la biomasa vegetal en R6 entre densidades de siembra x genotipos (test de Tukey).

Tabla 2.2. Diferencias (porcentuales) de la biomasa de las plantas en R6 entre la baja y la alta densidad de siembra para la línea endo-criada de maíz France 2 (*WT*) y sus líneas mutantes de fitocromos B (*phyB1* y *phyB2*) en dos experimentos (Exp.).

Genotipo	Biomasa de planta	
	Exp ₁	Exp ₂
WT	↓ 47,8 %	↓ 58,2 %
<i>phyB1</i>	↓ 22,17 %	↓ 47,39 %
<i>phyB2</i>	↓ 36,01 %	↓ 28,08 %

Cuando se analizó la tasa de crecimiento de las plantas alrededor de R1, se detectó una interacción significativa de la densidad de siembra x el genotipo en ambos Exp. (p : 0,07 y 0,02, en Exp1 y Exp2 ; respectivamente). En la menor densidad de siembra, la línea *WT* alcanzó la mayor tasa de crecimiento (Fig. 2.4 A, B). Sin embargo, en alta densidad, la tasa de crecimiento de las plantas no fue diferente entre los genotipos. Por lo tanto, las diferencias de las tasas entre las densidades de siembra resultó mayor para la línea *WT* que para las líneas mutantes.

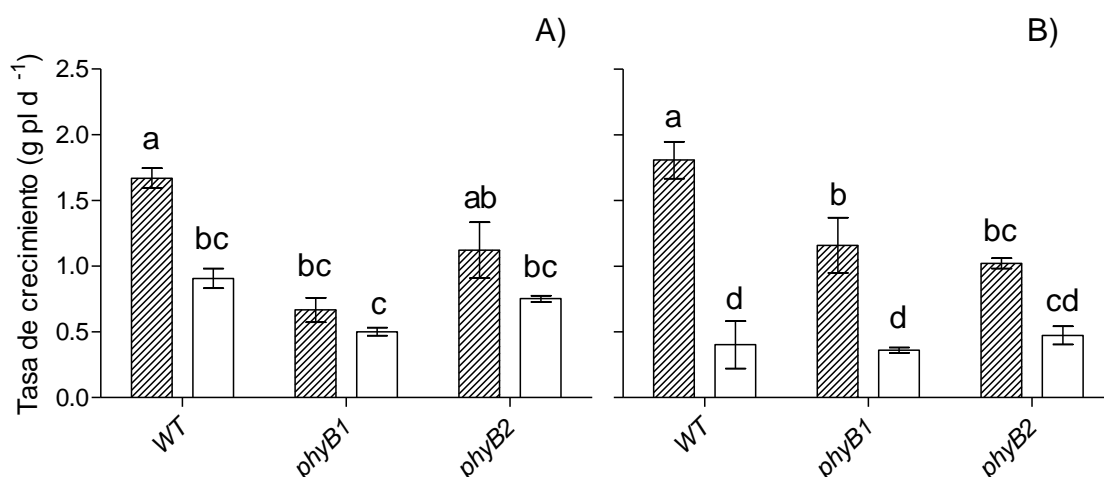


Figura 2.4. Tasa de crecimiento por planta alrededor de R1 (± 15 días alrededor de la floración femenina) de la línea endo-criada de maíz France 2 (WT) y sus líneas mutantes de fitocromos B (*phyB1* y *phyB2*) cultivadas en dos densidades de siembra contrastantes (columnas rayadas: baja densidad, columnas blancas: alta densidad) en Exp1 (A) y Exp2 (B). Las barras representan el error estándar de las medias. Las letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre densidades de siembra x genotipos (test de Tukey).

2.3.2. Altura de las plantas y diámetro de los tallos

En ambos Exp., la altura de las plantas fue afectada significativamente ($p: 0,09$ y $p: 0,03$ en Exp1 y Exp2; respectivamente) por la mutación del fitocromo B1. Este efecto se detectó a partir de los 329 °Cd (es decir, desde V3) en el Exp1 y desde los 1002 °Cd (es decir, desde V13) en el Exp2. Las plantas de *phyB1* resultaron más bajas que las WT, independientemente de la densidad de siembra (Fig. 2.5 A, B). En alta densidad, las plantas de todos los genotipos resultaron más altas que las cultivadas a menor densidad de siembra, aunque las diferencias en este rasgo sólo resultaron significativas ($p: 0,10$) en el Exp1 (Fig. 2.5 A).

Desde las etapas tempranas del crecimiento de las plantas (desde 329 °Cd, es decir, V3 en Exp1 y desde 630 °Cd, es decir, V7 en Exp2), las plantas de *phyB1* cultivadas en ambas densidades de siembra, exhibieron tallos más delgados ($p < 0,05$) que las WT y *phyB2* (Fig. 2.5 C, D). En el Exp1 la interacción densidad de siembra x genotipo resultó significativa ($p = 0,018$) desde los 733 °Cd (es decir, V11) (Fig. 2.5 C). En este Exp., las plantas WT y *phyB2* exhibieron tallos más delgados en la mayor densidad de siembra, mientras que los de *phyB1* no resultaron afectados por el estrés lumínico. Por el contrario, en el Exp2 los tallos de todos los genotipos resultaron más finos ($p = 0,0001$) en alta densidad de siembra desde los 536 °Cd (es decir desde V5) (Fig. 2.5 D).

En consecuencia, ante cambios en la densidad de siembra, las plantas *phyB2* resultaron las menos sensibles en elongación de tallos, mientras que los cambios en el diámetro de los tallos resultaron similares a los de la línea WT (Tabla 2.3).

Tabla 2.3. Diferencias (porcentuales) entre la baja y la alta densidad de siembra, en la altura de las plantas y el diámetro de los tallos en R1 para la línea endo-criada de maíz France 2 (*WT*) y sus líneas mutantes de fitocromos B (*phyB1* y *phyB2*) en dos experimentos.

Genotipo	Altura de tallo		Diámetro	
	Exp ₁	Exp ₂	Exp ₁	Exp ₂
<i>Wt</i>	↑17,22 %	↑8,35 %	↓ 25,41 %	↓28,79 %
<i>phyB1</i>	↑25,74 %	↑10,66 %	↓10,03 %	↓26,26 %
<i>phyB2</i>	↑8,50 %	↑9,41 %	↓20,70 %	↓21,05 %

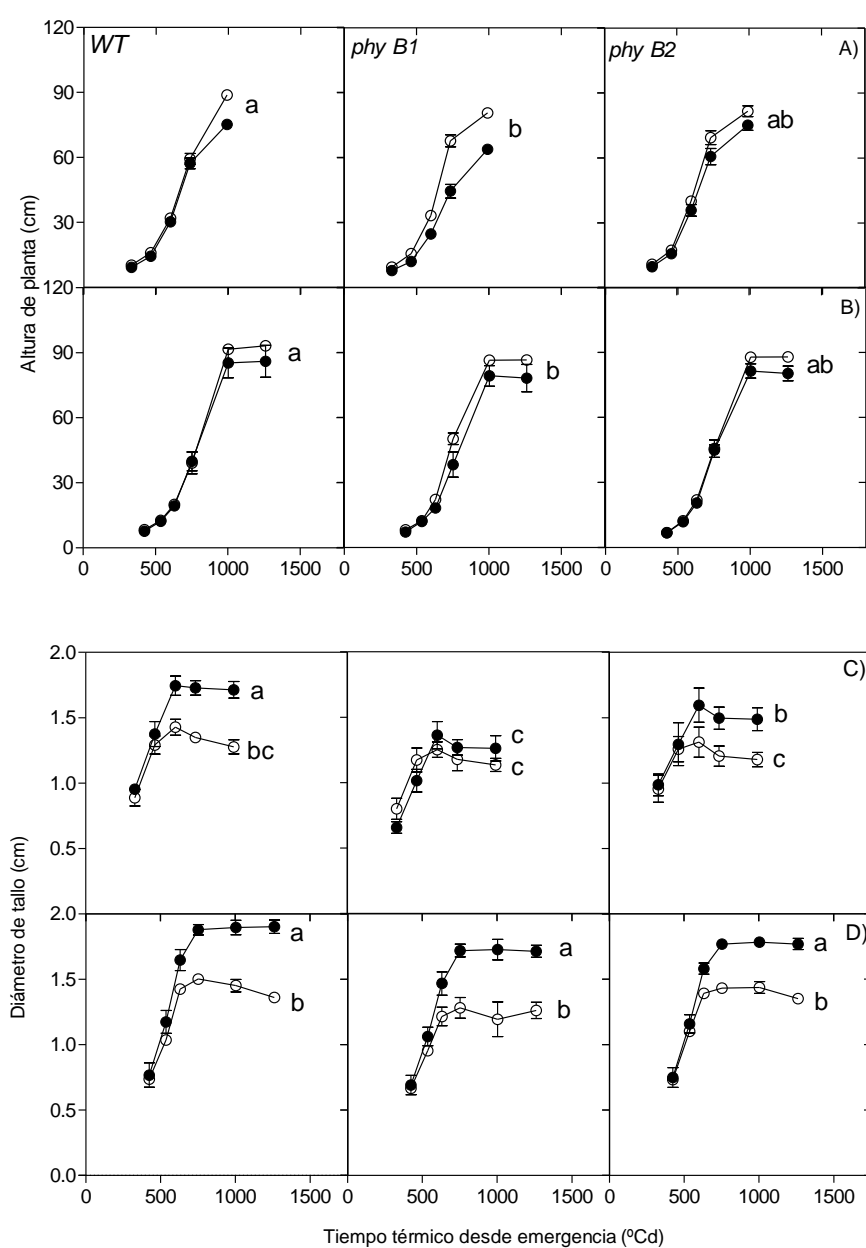


Figura 2.5. Evolución de la altura de las plantas (A y B) y el diámetro de la base de los tallos (C y D) de la línea endo-criada de maíz France 2 (*WT*) y sus correspondientes mutantes (*phyB1* y *phyB2*) cultivadas en dos densidades de siembra contrastantes (círculos negros: baja densidad, círculos blancos: alta densidad) en los Exp1 (A y C) y Exp2 (B y D). Las barras representan el error estándar de las medias. En A y B las letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los genotipos en el valor medio (promedio de dos densidades) de cada rasgo. En la C, las letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre densidades de siembra x genotipos (test Tuckey).

2.3.3 Área foliar

En el Exp1 ambas mutaciones de los fitocromos B redujeron ($p: 0,005$) el tamaño medio de las hojas independientemente de la densidad de siembra (Fig. 2.6 A). En el Exp2, se detectó un efecto significativo de la densidad de siembra x el genotipo ($p: 0,06$) sobre este rasgo. Las plantas *phyB2* exhibieron un menor tamaño que los otros genotipos, pero sólo en la menor densidad de siembra (Fig. 2.6B).

Por otro lado, en los dos Exp. y en ambas densidades, las plantas *phyB1* tuvieron el menor número de hojas ($p: 0,0005$ y $p: 0,002$, en Exp1 y Exp2; respectivamente) (Fig. 2.6 C, D). En consecuencia, en las dos densidades de siembra, ambas líneas mutantes exhibieron un menor área foliar por planta ($p: 0,0001$ y $p: 0,002$, respectivamente) que la *WT* (Fig. 2.6 E, F), debido al menor número total de hojas y /o al menor tamaño de las hojas.

2.3.4. Anatomía de las hojas

El patrón genotípico descrito anteriormente para el tamaño medio de las hojas también se detectó en el tamaño de la hoja de la espiga apical ($p: 0,002$), sin registrarse efectos de la densidad de siembra ($p: 0,95$) o interacciones del genotipo con la densidad ($p: 0,78$). En la baja densidad de siembra, ambas líneas mutantes exhibieron hojas más finas ($p: 0,004$) que la *WT* (212,9, 149,1 y 181,7 micrones, para *WT*, *phyB1* y *phyB2*; respectivamente).

El número total de células en el área estandarizada de todas las líneas se redujo ($p: 0,001$ y $p: 0,007$, para superficie foliar adaxial y abaxial; respectivamente) en respuesta al aumento de la densidad de siembra (Fig. 2.7 A, D), ya que las células resultaron más largas (Fig. 2.7 B, E) y anchas (Fig. 2.7 C, F) en alta densidad. Esta tendencia se observó tanto en la superficie adaxial (Fig. 2.7 A, B, C) como en la abaxial (Fig. 2.7, D, E, F).

La densidad de estomas en ambas caras de la hoja no fue afectada por la densidad de siembra o las mutaciones de los fitocromos B (Fig. 2.8 y 2.8). El número de estomas de la superficie abaxial fue casi el doble que el de la cara adaxial. En consecuencia, al menos para la hoja de la espiga apical, las líneas mutantes tuvieron un menor número total de células por

hoja, pero similar número de estomas por cm^2 (es decir, similar densidad de estomática) que la *WT*.

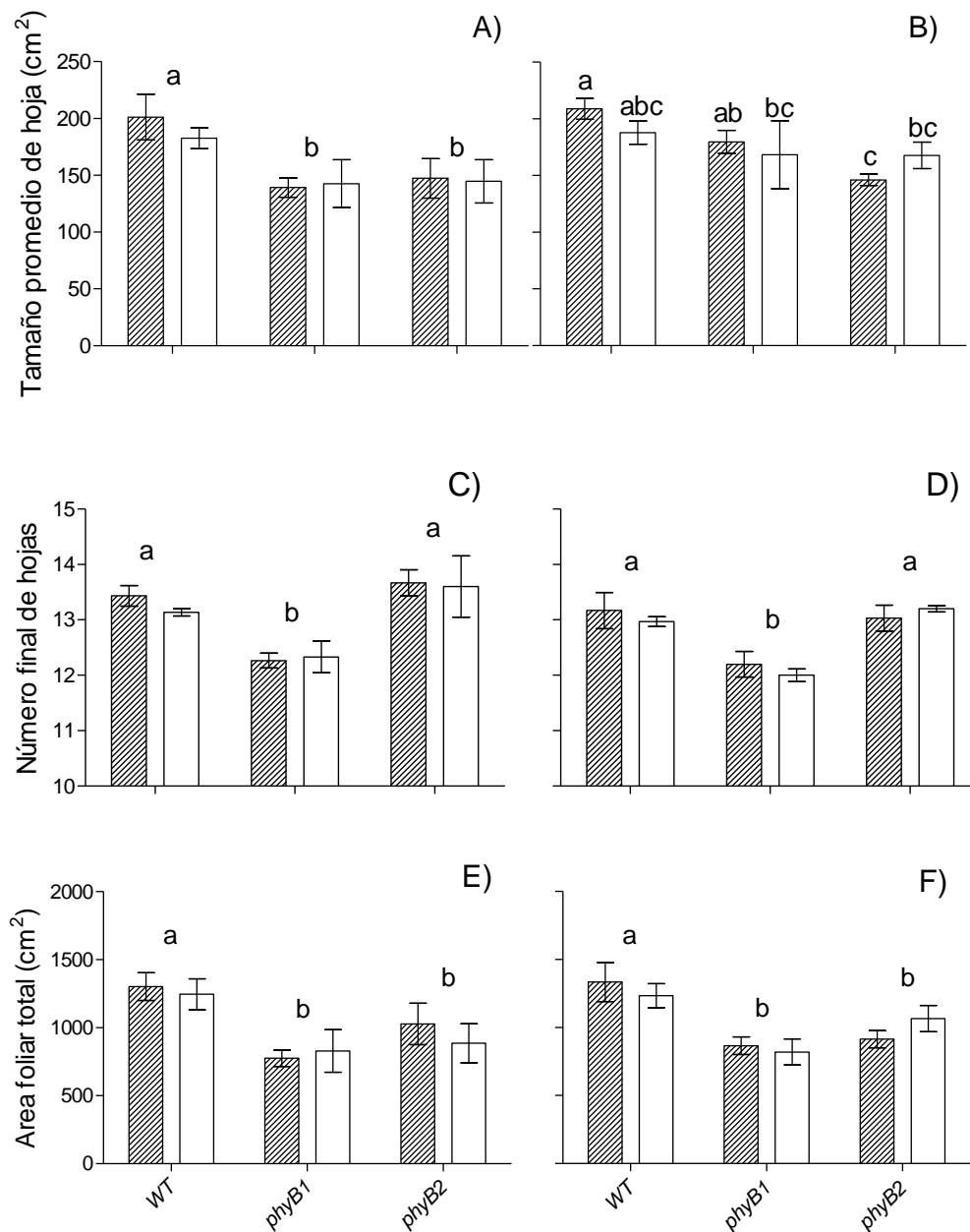


Figura 2.6. Tamaño promedio de las hojas (A y B), número total de hojas (C y D) y área foliar por planta (E y F) de la línea endo-criada de maíz France 2 (*WT*) y sus líneas mutantes de fitocromos B (*phyB1* y *phyB2*) cultivadas en dos densidades de siembra contrastantes (columnas rayadas: baja densidad, columnas blancas: alta densidad) en el Exp1 (A, C y E) y en el Exp2 (B, D y F). Las barras representan el error estándar de las medias. Las letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$; test de Tuckey) entre los valores medios de los genotipos (A, C, D, E, F) y entre densidades de siembra x genotipos (B).

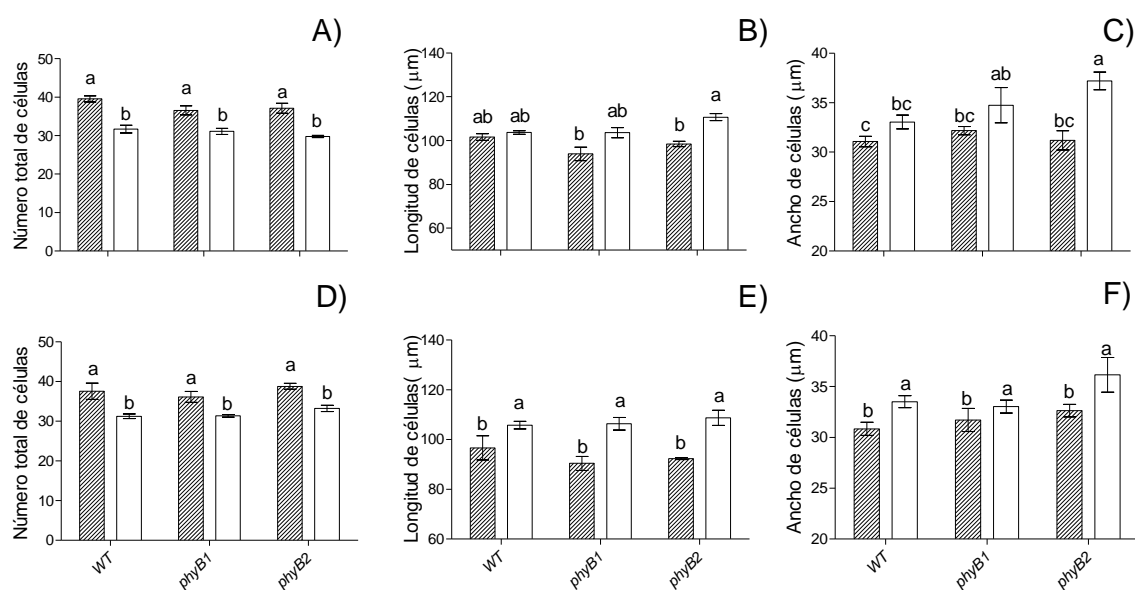


Figura 2.7. Número total de células (A y D) en un área estandarizada (60.000 μm^2), longitud de células (B y E) y ancho de células (C y F) de la cara adaxial (A, B y C) y abaxial de la hoja (D, E y F) de la línea endo-criada de maíz France 2 (*WT*) y sus líneas mutantes de fitocromos B (*phyB1* y *phyB2*) cultivadas en dos densidades de siembra contrastantes (columnas rayadas: baja densidad, columnas blancas: de alta densidad de siembra). Las letras indican diferencias entre las densidades de siembra (A, D, E, F) o entre densidades de siembra x genotipos (B, C) ($p < 0,05$; test de Tuckey).

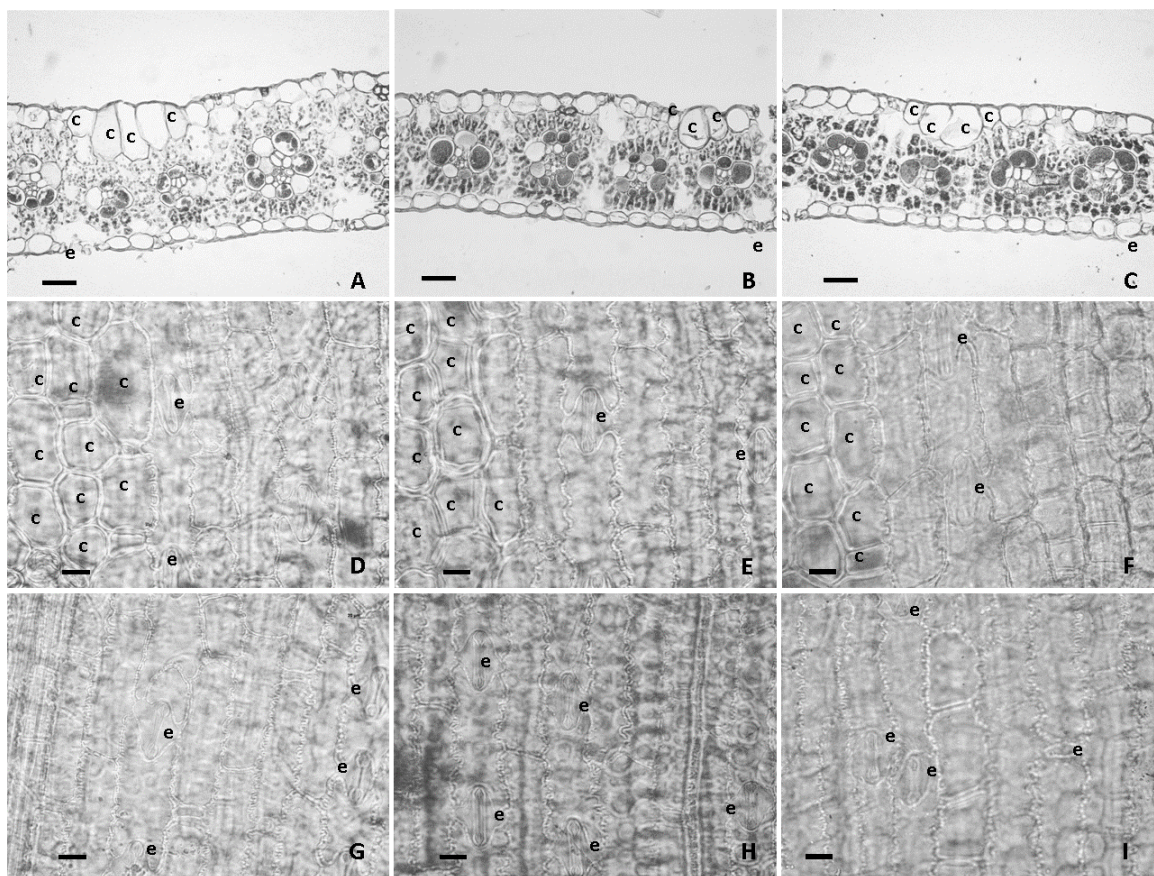


Figura 2.8. Fotografías de secciones transversales (A, B, C), epidermis adaxial (D, E, F) y epidermis abaxial (G, H, I) de la hoja de la espiga apical de la línea endo-criada de maíz France 2 (A, D, G) y sus líneas mutantes de fitocromos B: *phyB1* (B, E, H) y *phyB2* (C, F, I) en baja densidad de siembra en el Exp2. e: estomas; c: células buliformes. Las barras de escala representan: A-C = 50 μm y D-I = 20 μm .

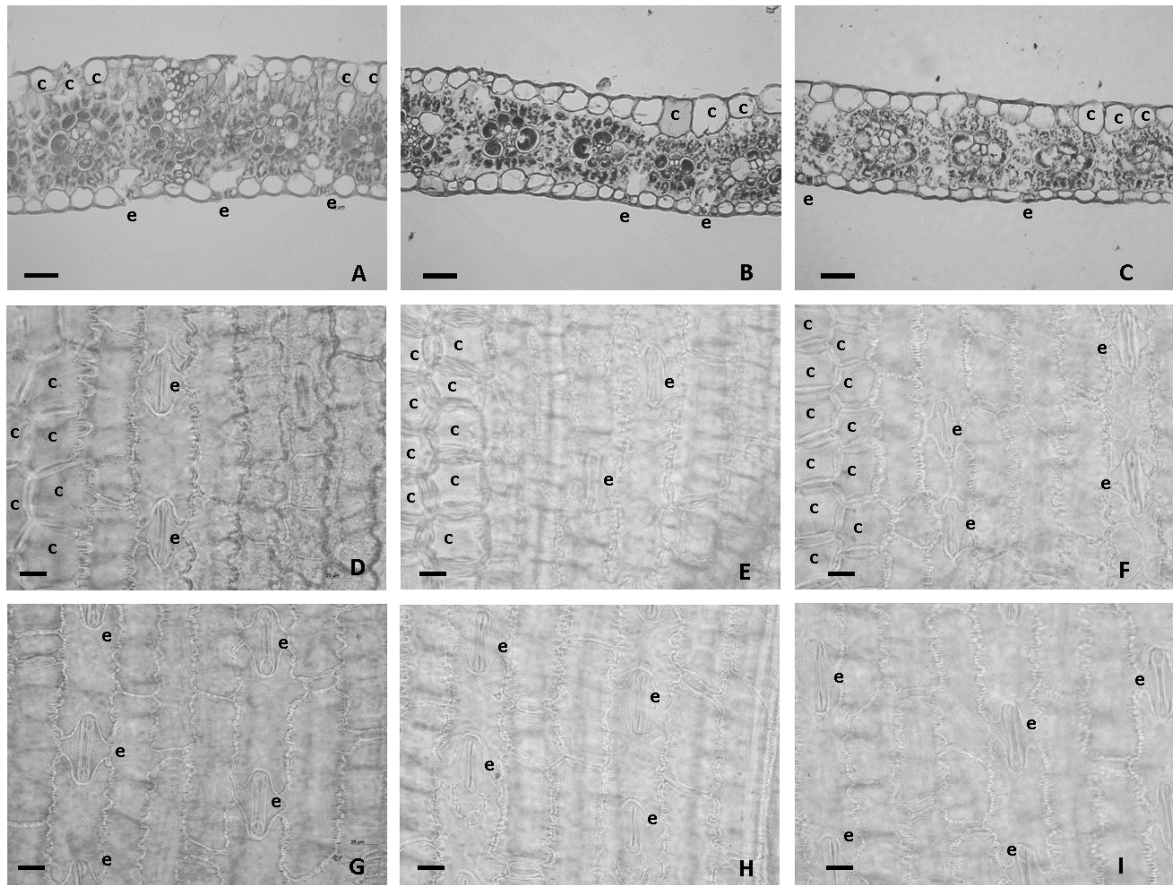


Figura 2.9. Fotografías de secciones transversales (A, B, C), epidermis adaxial (D, E, F) y epidermis abaxial (G, H, I) de la hoja de la espiga apical de la línea endo-criada de maíz France 2 (A, D, G) y sus líneas mutantes de fitocromos B: *phyB1* (B, E, H) y *phyB2* (C, F, I) en alta densidad de siembra en el Exp2. e: estomas; c: células buliformes. Las barras de escala representan: A-C = 50 μ m y D-I = 20 μ m.

2.3.5. Distribución azimutal de hojas

En ambos Exp. y en baja densidad de siembra, las plantas *WT* (Fig. 2.10 A, D) y *phyB2* (Fig. 2.10 C, F) mostraron una similar distribución azimutal de sus hojas con una mayor proporción orientadas hacia el entresurco, manteniendo el patrón impuesto por la disposición de los embriones a la siembra. Por el contrario, *phyB1* exhibió una distribución aleatoria (Fig. 2.10 B, E), que difirió de la frecuencia observada en las *WT* ($p < 0,05$ en ambos Exp.).

Considerando la respuesta al incremento en la densidad de siembra, *WT* en alta densidad exhibió la misma distribución azimutal que en baja densidad (Fig. 2.10 A, D), conservando una alta proporción de hojas perpendiculares a la hilera de siembra. Una tendencia similar se registró para *phyB2* pero con una mayor proporción de hojas hacia los entresurcos ($p < 0,05$) en el Exp2 (Fig. 2.10 C, F). La distribución de hojas de la línea *phyB1* fue afectada por la densidad de siembra ($p < 0,01$) en ambos experimentos, con una mayor proporción de hojas

perpendiculares a la hilera de siembra en el Exp2 (Fig. 2.10 E), pero con un patrón poco claro en el Exp1 (Fig. 2.10 B).

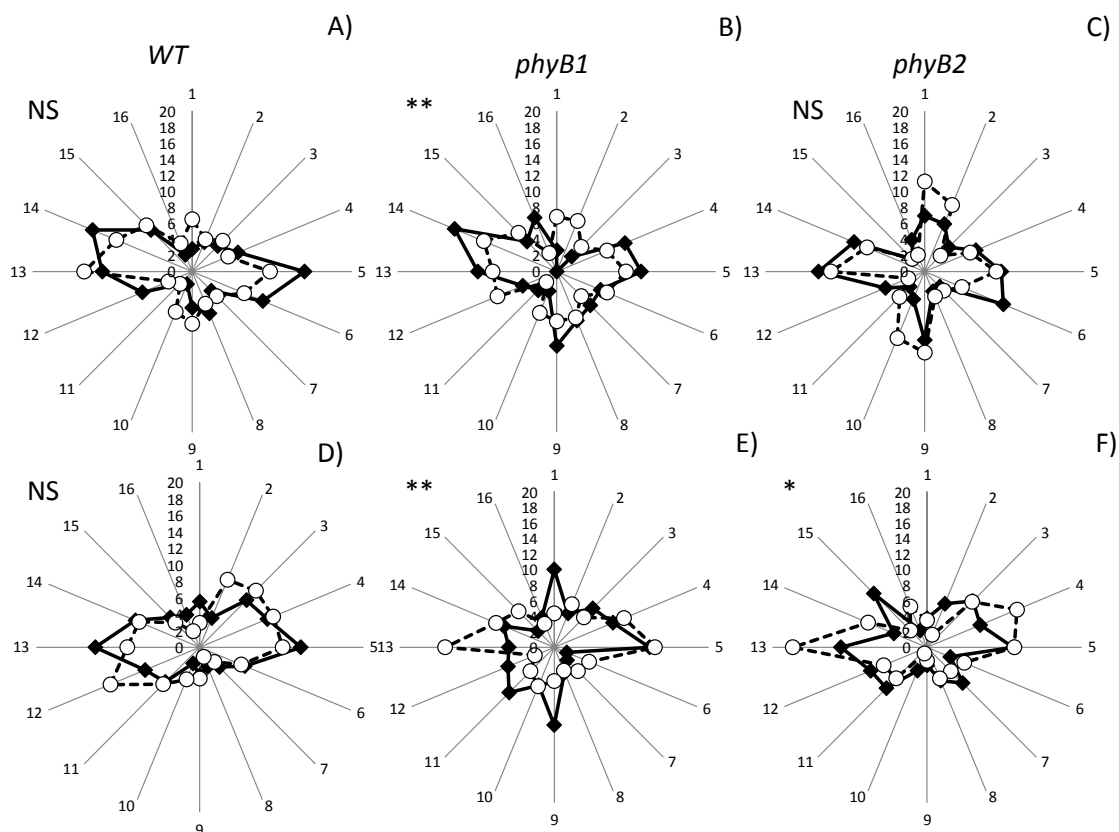


Figura 2.10. Distribución azimutal de las hojas de la línea endo-criada France 2 (*WT*; A, D) y sus mutantes de fitocromo B (*phyB1*; B, E y *phyB2*; C, F) cultivadas en dos densidades de siembra contrastantes (cuadrados negros y líneas sólidas: baja densidad, círculos blancos y líneas de puntos: alta densidad) en el Exp1 (A, B, C) y Exp2 (D, E, F). Los *, ** indican el grado de significancia ($p < 0,05$ y $p < 0,01$; respectivamente) de la prueba λ^2 para la comparación en la distribución de hojas entre densidades de siembra. Las línea 1 y 9 corresponde a la dirección de la hilera de siembra. Los números alrededor del círculo indican los dieciséis sectores de $22,5^\circ$. Cada punto representa la proporción de hojas en cada sector de 30 plantas.

2.3.6. Ambiente lumínico en el canopeo, eficiencia en el uso de la radiación (EUR) y tasa de crecimiento del cultivo

Cuando las plantas exhibieron todas su hojas completamente expandidas (es decir, cerca de R1), la relación R/RL alrededor de la base de los tallos de todos los genotipos se vio reducida significativamente (Norte p : 0,02, Sur p : 0.004, Este p : 0.0005 y Oeste p : 0.071) por el incremento de la densidad de siembra (Fig. 2.11), debido a una disminución del R y a un aumento del RL (datos no mostrados). Los factores genotipo y densidad de siembra x genotipo no afectaron la R/RL.

En ambos Exp. y para todos los genotipos, la máxima fIRFA se registró alrededor de R1 y resultó superior ($p = 0,001$ y $0,0004$ en Exp1 y Exp2; respectivamente) en alta densidad de siembra (Fig. 12). Entre genotipos la línea *phyB1* alcanzó la menor captura de RFA ($p = 0,08$ y $0,12$ en Exp1 y Exp2; respectivamente), independientemente de la densidad de siembra.

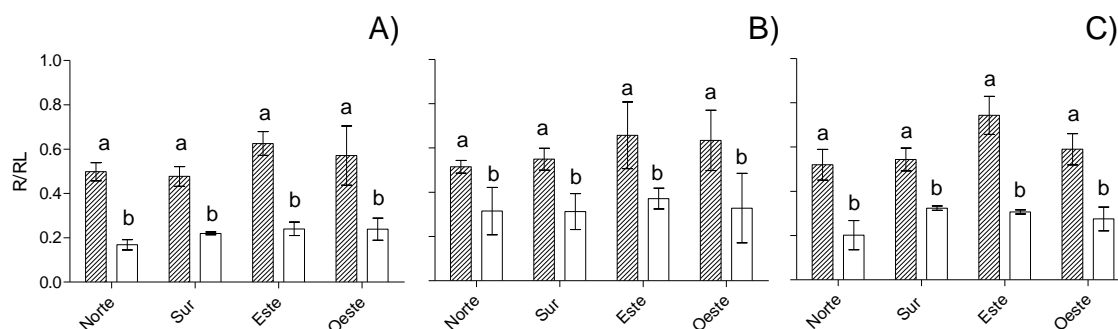


Figura 2.11. Calidad de la luz (relación R/RL) alrededor de la base de los tallos de la línea endocriada de maíz France 2 (WT; A) y sus mutantes de fitocromos B (*phyB1*; B y *phyB2*; C) cultivadas en dos densidades de siembra contrastantes (columnas rayadas: baja densidad, columnas blancas: alta densidad) durante el Exp2. Las mediciones se realizaron en R1, con la superficie sensible del sensor frente a los cuatro puntos cardinales. Los valores del Norte representan R/RL reflejada por cada planta hacia el entresurco. Valores al sur representan R/RL reflejada por las plantas de la hilera opuesta. La R/RL en el Este y el Oeste caracterizan la calidad de la luz entre las hileras. Las barras representan el error estándar de las medias. Las letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre densidades para cada punto cardinal (test de Tukey).

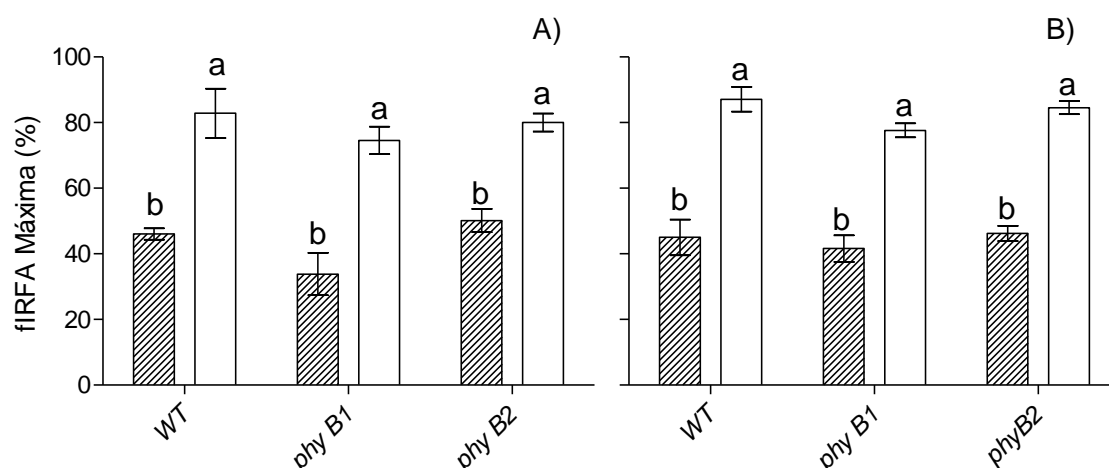


Figura 2.12. Máxima fracción de intercepción de la radiación fotosintéticamente activa (fIRFA máxima) en la floración femenina de la línea de maíz endocriada France 2 (WT) y sus mutantes de fitocromos B (*phyB1* y *phyB2*) cultivadas en dos densidades de siembra contrastantes (columnas rayadas: baja densidad, columnas blancas: alta densidad) en el Exp1 (A) y el Exp2 (B). Las barras representan el error estándar de las medias. Las letras indican diferencias significativas ($p < 0,001$) entre las densidades (prueba de Tukey).

En el Exp1 la tasa de crecimiento de los cultivos alrededor de R1 de todos los genotipos resultó mayor ($p: 0,0006$) en alta densidad que en baja densidad de siembra (Fig. 2.13). *WT* alcanzó las tasas más altas ($p: 0,0002$), *phyB2* valores intermedios y *phyB1* las tasas más bajas (Fig. 2.13 A). En el Exp2, se detectó un efecto significativo del genotipo x densidad de siembra ($p: 0,03$) este rasgo (Fig. 2.13 B). En la densidad más baja, ambas líneas mutantes exhibieron las tasas de crecimiento de cultivo mas bajas. Sólo *phyB2* exhibió una respuesta positiva de la tasa de crecimiento del cultivo al incremento de la densidad de siembra.

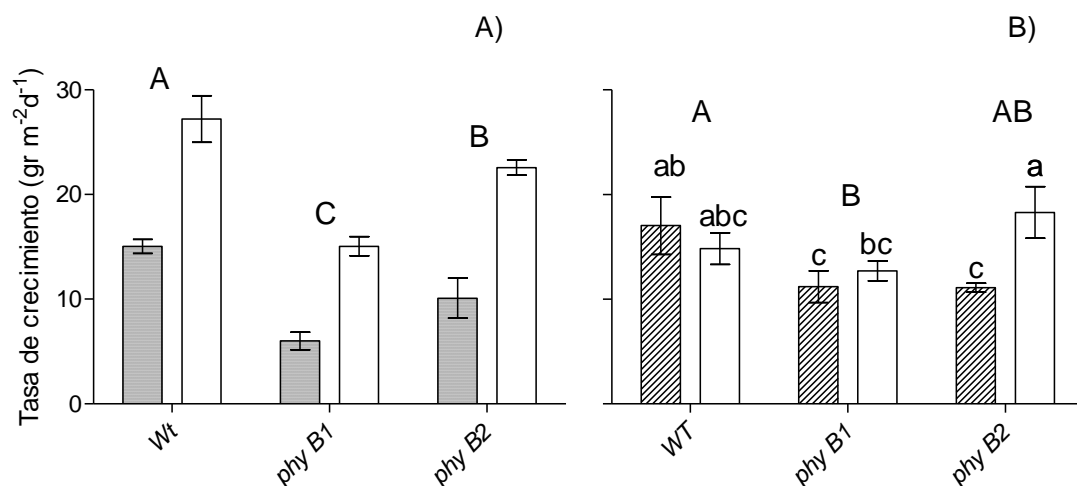


Figura 2.13. Tasa de crecimiento de los cultivos alrededor (± 15 días) de la floración femenina de la línea endo-criada de maíz France 2 (*WT*) y sus líneas mutantes de los fitocromos B (*phyB1* y *phyB2*) cultivadas en dos densidades de siembra contrastantes (columnas rayadas: baja densidad, columnas blancas: alta densidad) en el Exp1 (A) y el Exp2 (B). Las barras representan el error estándar de las medias. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los genotipos (media de dos densidades de siembra; A y B) o entre los tratamientos (densidad de siembra x genotipos; B) (test de Tukey y LSD Fisher, respectivamente).

Cuando se estimó la EUR alrededor de R1 (sólo en Exp2) *WT* y *phyB1* exhibieron una disminución significativa ($p: 0,0053$ y $p: 0,0079$) de la EUR con el incremento de la densidad de siembra. Por el contrario, la EUR de *phyB2* no se vio afectada por la densidad (Fig. 2.14 y Tabla 2.4).

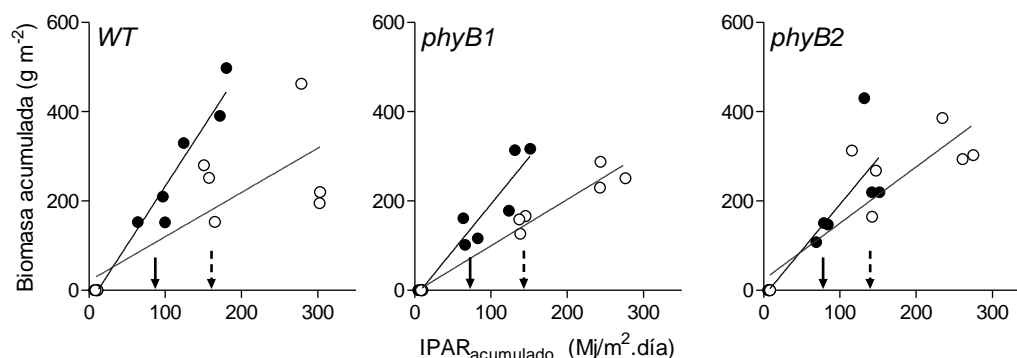


Figura 2.14. Relación entre el crecimiento de los cultivos (biomasa acumulada) y la captura de radiación (IRFA acumulada) alrededor de la floración femenina de la línea de maíz endo-criada France 2 (*WT*) y sus mutantes de los fitocromos B (*phyB1* y *phyB2*), cultivadas en dos densidades de siembra contrastantes (símbolos negros: baja densidad, símbolos blancos: alta densidad) en el Exp2. Flechas continuas y punteadas indican R1 en baja densidad y alta densidad, respectivamente.

Tabla 2.4. Estimación de la EUR a través de la pendiente de la función lineal ajustada a la relación entre la biomasa de los cultivos y la IRFA acumulada alrededor de floración (Fig. 2.14) para la línea endo-criada de maíz France 2 (*WT*) y sus mutantes de los fitocromos B (*phyB1* y *phyB2*) cultivadas en dos densidades de siembra contrastantes en el Exp2. Las comparaciones de la EUR entre densidades se realizaron mediante test de pendientes.

Densidad	Genotipo	EUR	Intervalos de confianza 95%	n	R ²
Baja	<i>WT</i>	2.635 ± 0.2174	2,120 - 3,149	9	0,9545
	<i>phyB1</i>	2.094 ± 0.2536	1,494 - 2,694	9	0,9069
	<i>phyB2</i>	2.057 ± 0.4533	0,9853 - 3,129	9	0,7464
Alta	<i>WT</i>	0.9903 ± 0.2964	0,2894 - 1,691	9	0,6147
	<i>phyB1</i>	1.038 ± 0.07848	0,8526 - 1,224	9	0,9615
	<i>phyB2</i>	1.262 ± 0.2500	0,6710 - 1,853	9	0,7846
Comparación entre densidades		<i>p</i> -valor	Grados de libertad		
<i>WT</i>		0,0035	14		
<i>phyB1</i>		0,0005	14		
<i>phyB2</i>		0,1488	14		

2.3.7. Producción de biomasa y rendimiento de los cultivos

En el Exp1 la producción de biomasa alcanzada por todos los genotipos en R6 resultó mayor (p : 0,009) en alta densidad de siembra que en baja densidad (Fig. 2.15 A). En ambas densidades, *phyB1* exhibió los menores (p : 0,02) valores de biomasa. En el Exp2 (Fig. 2.15 B) *phyB1* también exhibió menores (p : 0.06) valores de biomasa respecto a las otras líneas, pero

el incremento de la biomasa con la densidad de siembra sólo resultó significativo en las líneas mutantes ($p: 0,03$ para densidad de siembra x genotipo).

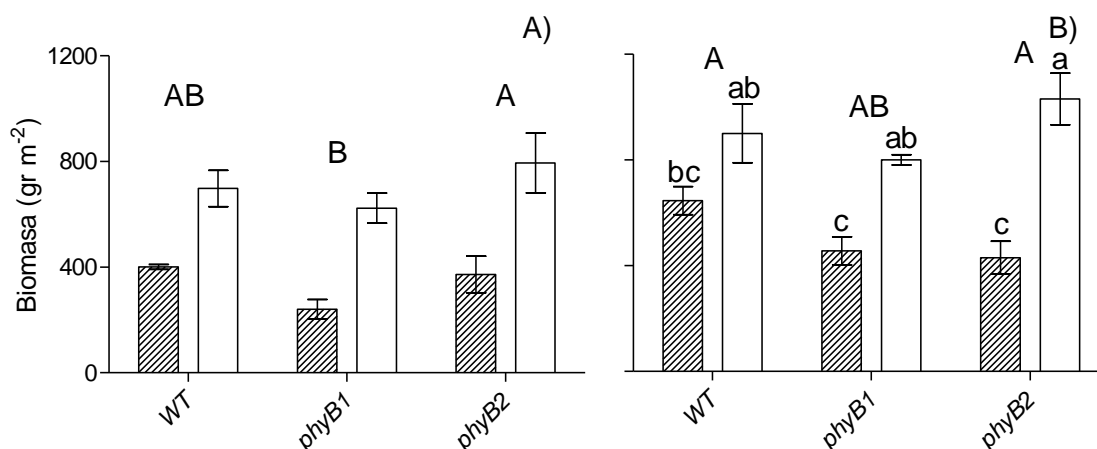


Figura 2.15. Biomasa de los cultivos a madurez fisiológica en la línea endo-criada France 2 (WT) y sus mutantes de los fitocromos B (*phyB1* y *phyB2*) cultivadas en dos densidad de siembra contrastantes (columnas rayadas: baja densidad, columnas blancas: alta densidad) en el Exp1 (A) y el Exp2 (B). Las barras representan el error estándar de las medias. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre genotipos (A y B). Letras minúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre densidades de siembra x genotipos (B) (prueba de Tukey).

Las diferencias en el rendimiento de grano entre genotipos y densidades se relacionaron con los efectos de los tratamientos sobre el número de granos por unidad de área, el cual fue determinado por el número de granos promedio por planta y la cantidad de plantas por unidad de superficie. Al aumentar la densidad de siembra, el número de granos por planta disminuyó ($p: 0,001$ y $0,02$, en Exp1 y Exp2; respectivamente) por la menor fertilidad de las plantas ($p: 0,03$ y $0,01$, en Exp1 y Exp2; respectivamente). Por ejemplo, en baja densidad de siembra la proporción de plantas fértiles fue de aprox. 0,86 en el Exp1 y 0,84 en el Exp2. En alta densidad de siembra, este rasgo disminuyó a 0,51 en el Exp1 y 0,72 en el Exp2. Considerando los genotipos el *phyB1* exhibió el menor ($p: 0,001$ y $0,015$, en el Exp1 y el Exp2; respectivamente) número de granos por planta en el promedio de ambas densidades. En consecuencia, en ambos Exp. *phyB1* alcanzó los rendimientos más bajos ($p: 0,0004$ y $p: 0,04$ en el Exp1 y el Exp2; respectivamente; Fig. 2.16 A,B). Por otro lado, sólo *phyB2* exhibió una respuesta positiva del rendimiento de grano al incremento de la la densidad de siembra en el Exp1 e igual tendencia no significativa en el Exp2 (Fig. 2.16 A, B).

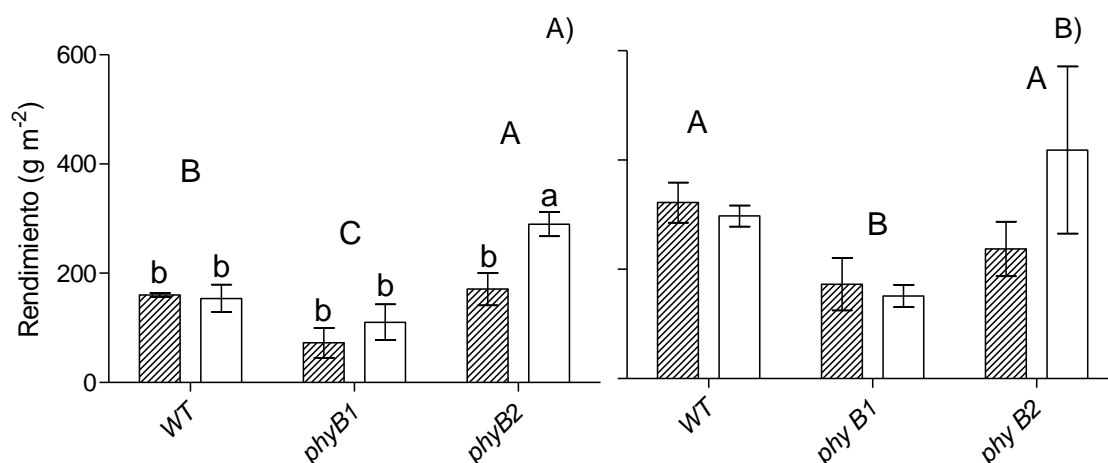


Figure 2.16. Rendimiento de grano de la línea endo-criada France 2 (*WT*) y sus mutantes de los fitocromos B (*phyB1* y *phyB2*) cultivadas en dos densidades de siembra contrastantes (columnas rayadas: baja densidad, columnas blancas: alta densidad) en el Exp1 (A) y el Exp2 (B). Las barras representan el error estándar de las medias. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre genotipos. Letras minúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las densidades de siembra x genotipos (A) (test de Tukey).

2.4. Discusión

El rol de los fitocromos B en el "síndrome de evasión de sombra" ha sido estudiado en arroz y maíz con fenotipos *WT* y sus mutantes en condiciones de planta aislada, manipulando artificialmente la calidad de la luz, o a nivel de cultivo pero utilizando densidades de siembra muy bajas (Liu et al., 2012; Sheehan et al., 2007; Takano et al., 2009). Otros estudios en cultivos de maíz sin mutaciones sugieren que estos fotorreceptores podrían estar involucrados en varias respuestas de la arquitectura de las plantas al incremento de la densidad de siembra (Kasperbauer and Karlen, 1994; Maddonni and Otegui, 2004; Maddonni et al., 2001). Sin embargo, en estos trabajos el diseño experimental utilizado para modificar la calidad de luz (cambios en la densidad de plantas) también reduce la cantidad de radiación por planta (Sattin et al., 1994; Smith et al., 1990). Consecuentemente, sólo los estudios a nivel de cultivo utilizando líneas *WT* y sus mutantes de fitocromos B en densidades de siembra contrastantes, podrían ayudar a analizar el papel de fitocromos B bajo una condición real de canopeo.

Los estudios de esta tesis han intentado esclarecer el papel de estos fotorreceptores con un enfoque en diferentes niveles de organización: tejidos y células (número y tamaño de las células del mesófilo de las hojas, espesor del mesófilo, densidad de estomas), órganos (dimensiones de tallos y hojas y orientación de las hojas), planta (área foliar, biomasa y crecimiento) y cultivo (captura de la radiación, EUR, producción de biomasa y rendimiento de

grano). Los rasgos se registraron en la línea de maíz France 2 (*WT*) y sus mutantes deletéreos de los fitocromos B (*phyB1* y *phyB2*) en densidades de siembra muy contrastantes.

A nivel de célula/tejido, órgano y planta, se pusieron a prueba las hipótesis i) (las líneas mutantes exhibirán un fenotipo de evasión de sombra aún en ambas densidad de siembra) y ii) (los fitocromos B son redundantes en las respuestas de los rasgos arquitecturales a la densidad de siembra). A nivel de cultivo, se intentó esclarecer el costo o beneficio de las respuestas fotomorfogénicas sobre la producción de biomasa y el rendimiento de grano.

Comenzando con el nivel de órgano, la altura de los tallos tanto de la línea *WT* como la de sus mutantes no mostraron cambios importantes en la respuesta (i.e. elongación) al aumento de la densidad de siembra y las plantas *phyB1* siempre fueron más bajas que las *WT*. En consecuencia, para este rasgo, la hipótesis i) fue rechazada. Sin embargo, la relación entre la altura final de las plantas y la densidad de siembra en cultivos de maíz puede ser descrita por una función cuadrática, ya que el largo del tallo aumenta o disminuye por debajo y por encima de una densidad determinada, respectivamente (Sangoi et al., 2002; Tetio-Kagho y Gardner, 1988a). A densidades de siembra inferiores al óptimo para la altura, el alargamiento de los entrenudos se promueve principalmente por la R/RL, mientras que en densidades superiores al óptimo, la elongación de los tallos está limitada por una fuerte restricción de asimilados (Maddonni et al., 2002; Rajcan y Swanton, 2001; Uhart y Andrade, 1991). Si las densidades de siembra de este trabajo se encontraran por debajo y por encima de la densidad que maximiza la altura de estas líneas, sería esperable no detectar grandes cambios en este rasgo y el rechazo de la hipótesis i) habría estado condicionado por la elección de las densidades utilizadas. Las mediciones de la longitud de los entrenudos podrían haber proporcionado evidencias más fuertes para esta hipótesis, ya que podrían existir crecimientos compensatorios entre los diferentes entrenudos de las plantas (Morrison et al., 1994). Por último, la mutación del *PhyB1* afectó la altura final de los tallos de *phyB1*, independientemente de la densidad de siembra (es decir, resultó un rasgo constitutivo de este mutante). Esta línea presentó una hoja menos por planta respecto a las otras líneas, mostrando que la anulación de la funcionalidad del *phyB1* produjo un efecto sobre la diferenciación de fitómeros, posiblemente a través de la interacción del fitocromo B1 con otros fotorreceptores responsables de la inducción floral, como se estableció para *Arabidopsis thaliana* (Casal, 2012) y maíz (Sawers et al., 2002). Sheehan et al. (2007) trabajando con las mismas líneas de esta tesis, reportó una similar altura y largo promedio de entrenudos para *phyB1* y *WT*, lo que sugiere un mismo número de fitómeros (rasgo no presentado en el mencionado estudio). La discrepancia con los resultados de esta tesis puede estar asociada con las diferentes temperaturas exploradas por los cultivos en ambas localidades (más altas en Buenos Aires que en Ithaca) durante el período de

inducción floral, que al interactuar con la sensibilidad fotoperiódica de cada línea (posiblemente mayor en *WT* que en *phyB1*) determine o no las diferencias en el número final de fitómeros (Kiniry et al., 1983).

Adicionalmente a lo observado en la altura de las plantas, la línea *phyB1* presentó tallos más delgados que la *WT* en ambas densidades de siembra (es decir, otro rasgo constitutivo del fenotipo *phyB1*). El menor diámetro de la línea doble mutante (*phyB1-phyB2*) reportado por Sheehan et al. (2007) a muy baja densidad de siembra sugiere una sinergia de ambos fitocromos B sobre el grosor de los tallos. Sin embargo, en aquel trabajo no se analizó la respuesta del diámetro de los tallos ante cambios en la densidad de siembra. Los experimentos de esta tesis revelan que la línea *WT* y ambas mutantes afinaron sus tallos en respuesta al aumento de la densidad de plantas, lo que sugiere que ambos fitocromos B estuvieron involucrados en esta respuesta (es decir, para este rasgo la hipótesis ii) no fue rechazada). Este rasgo, muy sensible al aumento de la densidad de siembra en híbridos comerciales de maíz (Boomsma et al., 2009), puede ser predisponente del vuelco de las plantas en altas densidades de siembra con la consecuente reducción de los rendimientos cosechables (Sangoi et al., 2002). Aunque en esta tesis se ha demostrado que ambos fitocromos B están involucrados en el afinamiento de los tallos, el bloqueo (i.e. nulidad de su función, fenotipo constitutivo de evasión) o la sobre-expresión (i.e. mayor sensibilidad del rasgo al estímulo) de estos fotorreceptores no parecen ser una opción viable para un mejor comportamiento de la resistencia al vuelco en esta especie. Una alternativa podría ser la producción de líneas de maíz con sobreexpresión del fitocromo A, que reduce la sensibilidad del crecimiento del tallo al R/RL, como se observó en plántulas de *Nicotiana tabacum* (Casal y Sánchez, 1994).

Siguiendo con el nivel de órgano, el tamaño de las hojas no fue afectado por la densidad de siembra, pero sí se redujo por la mutación de cualquiera de los fitocromos B (i.e. respuesta constitutiva de un fenotipo de evasión de sombra; aceptación de la hipótesis i) para este rasgo). Reducciones similares en el área foliar fueron reportadas en un mutante *PhyB* de arróz cuando las plantas aisladas se cultivaron en condiciones de alta R/RL (Liu et al., 2012). En el presente trabajo, el análisis a nivel de tejido permitió interpretar tanto los efectos de las mutaciones sobre el área foliar como los de la densidad de siembra. Así, ambas líneas mutantes mostraron un menor número de células por hoja que la línea *WT* (i.e. redundancia de ambos fitocromos sobre la división celular) sin afectar el tamaño de las células, determinando cambios en el área final de las hojas. Similarmente, el incremento de la densidad de siembra también redujo el número de células en la epidermis de las hojas de las tres líneas pero fue compensado por un mayor tamaño celular, lo que resultó para cada genotipo en similares áreas foliares en las dos densidades.

Estos resultados sugieren que ambos fitocromos B son necesarios para la regulación de la división celular del mesófilo de las láminas, y que las mutaciones generan un fenotipo de evasión de sombra para este rasgo (aceptación de la hipótesis ii). Sin embargo, ambas mutaciones no afectaron la expansión celular, probablemente debido a la independencia en la regulación de los procesos de división y expansión celular de las hojas de maíz (Tardieu et al., 1999). Este hecho se refleja en esta tesis por el compromiso o “trade off” entre el número y el tamaño de las células del mesófilo en las plantas cultivadas en densidades contrastantes. Coincidentemente, Carabelli et al. (2007) demostraron que las plantas de *Arabidopsis thaliana* irradiadas con baja R/RL disminuyeron la división celular de las láminas foliares. En el modelo de regulación para esta especie, PhyB actúa sobre la división celular a través de la inhibición de auxinas y/o citoquininas (Casal, 2012), hormonas que exhiben una alta actividad en los tejidos de división celular de la base de las hojas de maíz (Nelissen et al., 2012). Por el contrario, el crecimiento celular se regula por medio de giberelinas que actúan como señal para el inicio de este proceso en el tejido de transición de la lámina alejado de la base de las mismas (Nelissen et al., 2012). Llamativamente, los mutantes PhyB de arroz han mostrado una menor densidad de estomas respecto a la iso-línea *WT* en ambas caras de la epidermis foliar (Liu et al., 2012). Por el contrario, en esta tesis no se encontraron diferencias entre tratamientos en este rasgo, lo que sugiere que las líneas mutantes de los fitocromos B tuvieron un potencial de asimilación de carbono similar por unidad de área foliar respecto a la *WT*. La asimilación total por hoja, sin embargo, habría estado limitada por el menor tamaño de las láminas (Duncan, 1971).

Pasando a la escala de planta, uno de los mecanismos del síndrome de evasión de sombra que modifica la incidencia de la radiación sobre las hojas es la orientación espacial de estos órganos (Maddonni et al., 2002). En el mencionado trabajo, se comprobó que en maíz es una respuesta localizada a la irradiancia con baja intensidad de R/RL, lo que sugiere que los PhyB estarían implicados en esta respuesta. En esta tesis, las plántulas fueron forzadas a crecer con sus primeras hojas orientadas preferentemente en forma perpendicular a la hilera de siembra. En baja densidad, esta orientación inicial podría o no verse alterada, mientras que en alta densidad la orientación perpendicular a las hilera sería la condición necesaria para reducir la interferencia entre las hojas de plantas vecinas (Maddonni et al., 2002). Las líneas *WT* y *phyB2* exhibieron hojas perpendiculares a la hilera de siembra en ambas densidades. En contraste, la *phyB1* siempre presentó un menor grado de regulación en este mecanismo. En consecuencia, los PhyB presentaron una respuesta diferencial en este rasgo (aceptación de hipótesis ii), y *PhyB1* estaría implicado en la orientación azimutal de las hojas. Se documentó que la orientación azimutal de las hojas alrededor de espiga tiene un efecto positivo sobre el rendimiento de grano de las plantas de maíz (Toler et al., 1999). Por lo tanto, sería promisorio

incluir este rasgo secundario en programas de mejoramiento de este cultivo para alta densidad de siembra, ya que ha sido reportada variabilidad genotípica en híbridos y líneas endo-criadas (Maddonni et al., 2001; Pagano et al., 2007). Sin embargo, a la fecha no ha sido estudiada la heredabilidad de este rasgo.

Resumiendo las diferencias fenotípicas halladas, *phyB1* exhibió plantas más bajas, tallos más delgados, hojas más pequeñas, un menor número de hojas y una falta de control en la orientación azimutal de sus láminas. Por otra parte, las plantas *phyB2* sólo presentaron un menor tamaño de hojas que las *WT* (aceptación hipótesis ii, *PhyB1* y *PhyB2* tienen efectos diferenciales sobre los rasgos estudiados). Por lo tanto, la mutación del *PhyB1* parecería comprometer más la arquitectura de las plantas y su reactividad al estrés por luz que la mutación del *PhyB2*. Sin embargo las plantas de ambas mutaciones, presentaron un menor crecimiento que las *WT* en baja densidad de siembra pero una biomasa similar en alta densidad. Estos resultados indican que los cambios en el crecimiento de las plantas ante modificaciones de la densidad de siembra (Andrade et al., 1999) no sólo estarían gobernados por la cantidad de luz interceptada por las plantas sino también por la calidad de la luz, siendo los fitocromos B responsables de estas respuestas.

Integrando los resultados del área foliar de las plantas al nivel del canopy, los cultivos de ambas líneas mutantes deberían haber alcanzado menores FIRFA máximos. Sin embargo, en baja densidad todas las líneas llegaron a una similar captura de luz cerca de la floración femenina, posiblemente por los cambios en otros rasgos arquitecturales de planta (por ejemplo, el ángulo vertical de las hojas, longitud de la hoja hasta el punto de quiebre, longitud de los entrenudos) no medidos en esta tesis y que pueden afectar la relación entre tamaño del canopy y la captura de luz (Duncan, 1971; Miralles y Slafer, 1997; Pepper et al., 1977). En consecuencia, los efectos de las mutaciones de los fitocromos observados a nivel de célula/tejido (mesófilo foliar), órgano (área de las láminas) y planta (área foliar), no se detectaron a nivel de cultivo al registrar los valores de FIRFA. Del mismo modo, en alta densidad los valores de FIRFA resultaron similares entre líneas, pero superiores a los registradas en baja densidad (Andrade et al., 1999; Williams et al., 1968). En consecuencia, todas los cultivos de estas líneas deberían presentar una respuesta positiva del crecimiento al incremento de la densidad (Gosse et al., 1986; Muchow et al., 1990). En el Exp1, todas las líneas alcanzaron las mayores tasas de crecimiento en alta densidad de siembra, sin embargo en ambas densidades el crecimiento del cultivo *WT* resultó superior al del *phyB1*. Estos resultados sugerirían un efecto de la nulidad de *PhyB1* sobre la EUR. Cuando la EUR fue estimada (Exp2), para las líneas *WT* y *phyB1* se observó una solución de compromiso entre la captación de RFA y la EUR, determinando similares tasas de crecimiento y biomásas totales

entre densidades (Maddonni y Otegui, 2006). En contraste, la tasa de crecimiento de cultivo de *phyB2* fue regulada únicamente por la captura de radiación ya que la EUR se mantuvo estable, presentando mayores tasas y biomasa en alta densidad. Sería necesario llevar a cabo más experimentos para corroborar el papel de *PhyB1* y *PhyB2* sobre la EUR en densidades de siembra contrastes. Mediciones de fotosíntesis a nivel foliar y de cultivo serían necesarias para establecer relaciones entre estas variables, el área foliar de las plantas, la densidad de estomas y el intercambio de carbono (Boote y Loomis, 1991; Boote y Pickering, 1994; Liu et al., 2012).

Las diferencias en la tasas de crecimiento de los cultivos alrededor de floración se vieron reflejada en la producción de biomasa total. Varios autores han especulado si las respuestas fotomorfogénicas en especies cultivadas son un relictos de sus antepasados con un efecto perjudicial de la productividad en sistemas cultivados (Ballare et al., 1997; Casal y Ballare, 2000). De acuerdo con los resultados registrados en la producción de biomasa del cultivo, *phyB1* alcanzó los rendimientos de grano más bajos, mientras que *phyB2* fue la única línea con una respuesta positiva del rendimiento al aumento de la densidad de siembra, alcanzando valores similares o mayores que la *WT*, debido a una mayor proporción de plantas fértiles. En consecuencia, este rasgo podría estar asociado con la actividad de PHYB1 en ausencia de PHYB2 (es decir, en las formas activas de ambos PHYB, un antagonismo podría afectar la fertilidad de la planta en alta densidad de siembra). La línea con la actividad nula de ambos PHYB (*phyB1-phyB2*) no se incluyó en estos experimentos debido a la esterilidad casi completa de sus plantas, otro hecho que refuerza la hipótesis de la función de PHYB1 sobre la fertilidad de plantas bajo estrés por alta densidad de siembra. La capacidad de una línea de maíz para mantener una alta proporción de plantas fértiles en condiciones de cultivo, es una característica de gran importancia en el programa de mejoramiento de esta especie para la producción de semillas híbridas. D'Andrea et al., (2006) registraron diferencias en la fertilidad de plantas entre líneas de maíz en condiciones de baja disponibilidad de N. Además, la tolerancia al estrés por densidad en los híbridos modernos de maíz está determinada en parte por la alta proporción de plantas fértiles bajo estreses abióticos (Luque et al., 2006). Sería interesante realizar estudios más detallados sobre los mecanismos que subyacen en la determinación de la fertilidad de las plantas de maíz basados en el comportamiento de la línea mutante *phyB2* bajo estrés por alta densidad.

2.5. Conclusiones

En este capítulo se analizó el rol de los PhyB en cultivos de maíz bajo dos densidades de siembra contrastantes, a través de diferentes niveles de organización como célula/tejido,

órgano, individuo y cultivo. Esta aproximación resulta particularmente importante para evitar las conclusiones erróneas que se originan cuando se trata de integrar los resultados de un nivel de análisis en el nivel inmediato superior así como cuando se extrapolan los resultados de condiciones controladas al entorno real del campo (Passioura y Angus, 2010). A nivel de planta, se obtuvieron fuertes evidencias de que la altura, el diámetro de los tallos, el tamaño y número de hojas y la orientación espacial de las hojas fueron regulados por el Phy1 y sólo el tamaño de las hojas fue también regulado por PhyB2. El origen del menor tamaño de las hojas de las dos líneas mutantes se esclareció a nivel de tejido, demostrando que ambos fitocromos están implicados en la división celular de la epidermis de las láminas foliares, pero no en la expansión de estas células. A nivel de planta, se esclareció que ambos phyB regulan el crecimiento a través de la percepción de la calidad de la luz que perciben. A nivel de canopeo, los efectos de las mutaciones sobre la superficie foliar no se reflejaron en cambios en la captura de luz máxima respecto a la línea *WT*. El crecimiento de los cultivos, la producción de biomasa y el rendimiento de grano, sin embargo, se vio afectado por ambas mutaciones de fitocromo B, con una penalidad mayor cuando las plantas tuvieron anulada la actividad de PHYB1 (i.e. *phyB1*) y con un mayor rendimiento de *phyB2* en alta densidad de siembra por mayor fertilidad de las plantas.

En el capítulo siguiente se analizará como operan los rasgos arquitecturales de las plantas de cada isolinea en la variabilidad poblacional del crecimiento en monoculturas y en la habilidad competitiva de los individuos en canopeos mixtos (i.e. poli-culturas).

Capítulo 3

**Rol de los fitocromos B en la variabilidad poblacional del cultivo
y la habilidad competitiva de las plantas en poli-culturas ante
densidades de siembra contrastantes**

3.1. Introducción

En el capítulo anterior se describió el efecto de la ausencia de los fitocromos B1 y B2 sobre la respuesta de los rasgos arquitecturales de planta involucrados en el síndrome de evasión de sombra y su implicancia sobre el crecimiento individual de las plantas. La línea *phyB1* presentó una menor área foliar que la *WT* debido a un menor número y tamaño de sus hojas, tallos más cortos y finos, y una falta de control en la orientación azimutal del área foliar. Las plantas de la línea *phyB2* sólo se diferenciaron de las *WT* en el menor tamaño de las hojas. Como consecuencia, en baja densidad de siembra, ambas mutantes presentaron una menor tasa de crecimiento que las *WT*, pero esta última exhibió la mayor reducción de su crecimiento en respuesta al estrés por luz. Dado que los fitocromos promueven cambios morfológicos en las plantas que pueden modificar su habilidad por la captura de luz (Ballare et al., 1997), resta aún conocer de qué manera plantas de cada iso-línea compiten entre sí en condiciones de cultivo (i.e. en mono-culturas) y como lo hacen en cultivos mixtos (i.e. poli-culturas).

El análisis de la variabilidad poblacional del crecimiento de las plantas de una comunidad, es utilizado como indicador del grado de competencia entre individuos de esa población (Edmeades y Daynard, 1979). En maíz, el incremento de la variabilidad poblacional puede resultar en una penalidad en el rendimiento del cultivo (Andrade y Abbate, 2005; Tollenaar y Wu, 1999). Este fenómeno se origina por la relación curvi-lineal entre el número de granos por planta y la tasa de crecimiento de las plantas durante el período crítico (Andrade et al., 1999; Tollenaar y Aguilera, 1992). Como consecuencia de la competencia asimétrica por luz, las plantas más suprimidas del stand pueden exhibir alrededor de floración tasas de crecimiento muy cercanas al umbral de esterilidad, y su baja o nula fijación de granos puede no ser compensada por la mayor granazón de las plantas dominantes (Maddonni y Otegui, 2006; Pagano et al., 2007b). Por lo tanto, para sostener el rendimiento del cultivo sería necesario reducir la variabilidad del crecimiento de las plantas especialmente alrededor de floración. Probablemente comunidades de plantas con distintos estados activos de los fitocromos B puedan asistir en este objetivo. En este capítulo se postula que i) las plantas mutantes de fitocromos B en mono-culturas presentan una menor variabilidad poblacional del crecimiento que las *WT*, especialmente en alta presión de competencia (i.e. alta densidad de siembra) y ii) en poli-culturas las plantas *WT* presentarán distinta habilidad competitiva respecto las líneas mutantes de fitocromos B, determinando penalidades sobre el rendimiento del cultivo en alta densidad de siembra.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Diseño experimental

Para poner a prueba las hipótesis, se analizaron las variables de planta descritas en el capítulo 2 tanto en mono-culturas (ver detalles de medición y diseño experimental en el capítulo 2) como en poli-culturas (ver 3.2.2).

3.2.2. Mediciones

A partir de V_3 y hasta R_3 , se estimó semanalmente la biomasa individual de todas las plantas etiquetadas por medio de los modelos alométricos detallados en el capítulo 2. También se cuantificó el área foliar en R_1 y la tasa de crecimiento de las plantas alrededor del período crítico. En R_6 se cosecharon las espigas y se obtuvo el rendimiento por planta y por unidad de superficie. Como cada planta estuvo individualizada dentro de la poli-cultura, fue posible calcular todos estos rasgos para cada genotipo de las mezclas.

3.2.3 Estimación de la variabilidad poblacional en mono-culturas y comportamiento de las iso-líneas en poli-culturas

Numerosos autores han puesto el foco de sus trabajos en entender la competencia entre individuos en un stand de plantas genéticamente homogéneo a través de su descripción y cuantificación. Como el grado de desigualdad es un proceso dinámico y poblacional (i.e. no es un atributo de una planta sino del cultivo y no refleja un estado final sino un proceso) distintas aproximaciones han sido desarrolladas, cada una con sus limitaciones (Edmeades y Daynard, 1979; Vega y Sadras, 2003; Weiner y Thomas, 1986). Tal es así que el coeficiente de variación (CV, desvío estándar sobre la media) se condiciona por la magnitud del denominador, la descripción de las curvas poblacionales (curtosis y asimetría) no contempla la magnitud del valor más frecuente (media) y el coeficiente de GINI describe muy bien el tamaño de desigualdad pero no puede ser sometido a test de hipótesis. En este trabajo el CV fue utilizado como descriptor del grado de variabilidad entre plantas ya que no presentó divergencia con el Coeficiente de GINI (análisis preliminares presentaron similares tendencias, datos no mostrados) y puede ser sometido a test de hipótesis mediante el análisis de varianza (ANOVA).

Por otro lado, a través del seguimiento de la biomasa individual de cada genotipo se pudo establecer su habilidad competitiva en las mezclas. Para evaluar el comportamiento de los componentes en las poli-culturas se utilizó el equivalente de uso de la tierra (LER del inglés Land Equivalent Ratio) (Fukai, 1993; Monzon et al., 2014). Este coeficiente se construye a partir de la sumatoria de los rendimientos relativos (RR) de cada componente de una poli-cultura (ecuaciones 3.1 y 3.2).

Ejemplo para dos componentes:

$$LER = RR_{ij} + RR_{ji} \quad (3.1)$$

$$RR_{ij} = R_{ij}/R_{ii} \text{ y } RR_{ji} = R_{ji}/R_{jj} \quad (3.2)$$

donde RR_{ij} es el rendimiento relativo del componente i en la mezcla con el componente j , RR_{ii} es el rendimiento del componente i cuando crece puro.

En el caso de las poli-culturas de dos genotipos, si ambos integrantes experimentan igual intensidad de competencia en la mono-cultura que en la poli-cultura (i.e. su rendimiento por planta resulta similar en ambas culturas), los RR son cercanos a 0.5 (ya que en el RR de cada componente es proporcional a su participación en la mezcla) y el LER resulta cercano a 1. Por el contrario, cuando existe interacción entre los componentes, si el LER es >1 refleja a) un mejor comportamiento de ambos genotipos en la poli-cultura (i.e. interacción positiva), b) un mejor comportamiento de un genotipo en la poli-cultura que en la mono-cultura y otro con similar comportamiento en ambas culturas, o c) un componente se beneficia en la poli-cultura y el otro se ve muy perjudicado (i.e. competencia).

3.2.4. Análisis de datos

Para analizar la variabilidad poblacional de la biomasa de las plantas (hipótesis i) de cada mono-cultura, se realizó un ANOVA de los CV de biomasa en los distintos momentos de muestreo, considerando como factor principal la densidad de siembra y sub-factor al genotipo (*WT*, *phyB1* o *phyB2*). Para analizar las diferencias de los distintos rasgos (biomasa individual, altura final del tallo, área foliar total y tasa de crecimiento en el período crítico) entre los genotipos en las poli-culturas (segunda hipótesis, habilidad competitiva) se utilizó también un ANOVA considerando a la densidad como efecto principal, y a cada genotipo que involucró la respectiva poli-cultura como sub-factor (e.g. para la poli-cultura *WT/phyB1*, el efecto principal fue la densidad –alta y baja– y el sub-factor fue el genotipo –*WT* y *phyB1*–).

Cuando se analizaron los rendimientos de todas las culturas (i.e. mono y poli-culturas) el factor principal fue la densidad y la cultura el sub-factor (*WT*, *phyB1*, *phyB2*, *WT/phyB1*, *WT/phyB2*, *phyB1/phyB2* y *WT/phyB1/phyB2*).

3.3. Resultados

3.3.1. Variabilidad poblacional de la biomasa de las plantas en mono-culturas

Los efectos de la densidad poblacional y el genotipo sobre la biomasa promedio de las plantas en mono-culturas ya fueron presentados en el Capítulo 2 (Fig. 2.3). En las *WT*, ante el incremento de la densidad de siembra, la disminución de la biomasa y los mayores valores de DS (datos no mostrados) se vieron reflejados en mayores CV (Fig. 3.1 A y D), principalmente desde R1 (p : 0.0225 y p : 0.064 para Exp.1 y Exp.2, respectivamente) hasta el final del ciclo. Por el contrario la mono-cultura *phyB1* (Fig 3.1B y E) y la *phyB2* (Fig. 3.1C y F) presentaron bajos valores de CV a lo largo del ciclo tanto en baja densidad como en alta densidad de siembra (sólo la mono-cultura del *phyB1* en baja densidad de ambos Exp. presentó un mayor CV a los 750 °Cd y la del *phyB2* en alta densidad en R1 del Exp. 1), debido a disminuciones similares de la biomasa y ligeros cambios del DS. Estas respuestas ponen de manifiesto que el estado activo de ambos fitocromos resulta funcional para incrementar la variabilidad poblacional de la biomasa en respuesta al estrés por luz.

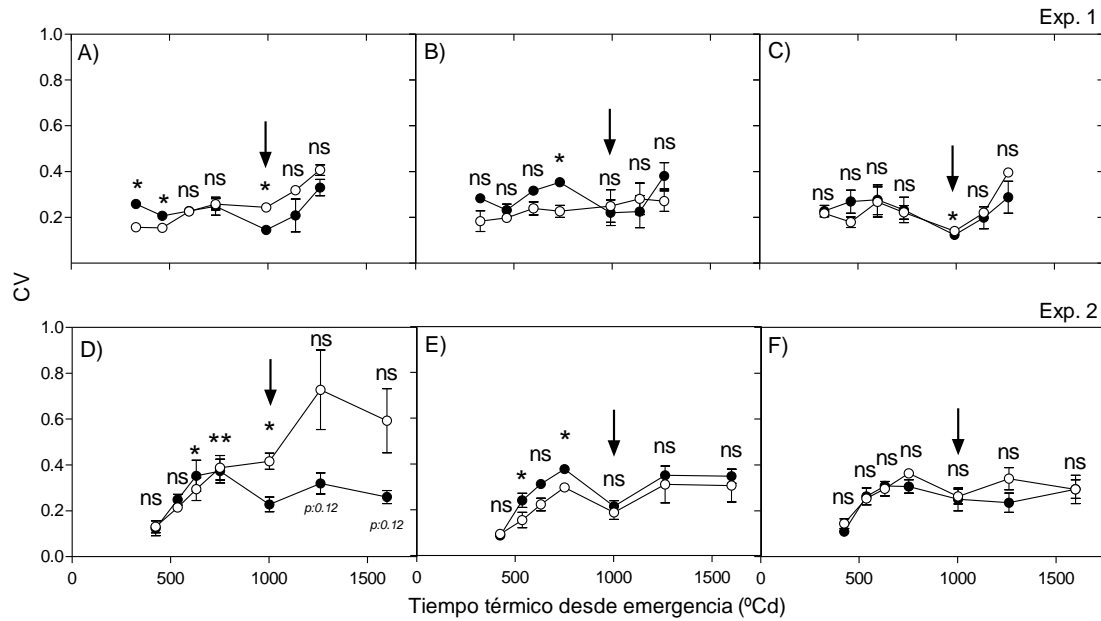


Figura 3.1. Evolución temporal del CV de la biomasa de las plantas en mono-culturas de *WT*, A) y D); *phyB1*, B) y E) y *phyB2* C) y F) durante las campañas 2009-10 (Exp1.) y 2011-12 (Exp2). Círculos negros indican mono-culturas en baja densidad de siembra (9 pl.m⁻²) y círculos blancos, mono-culturas en alta densidad de siembra (30 pl.m⁻²). Las barras indican el error estándar entre repeticiones y los * las diferencias significativas (*, $p < 0.05$ test de Tukey) entre densidades para cada fecha de medición. Las flechas señalan el tiempo de floración femenina de cada mono-cultura.

3.3.2. Crecimiento de cada genotipo en poli-culturas

En la poli-cultura *WT/phyB1* de ambos experimentos, la densidad de siembra no afectó el crecimiento de ambos genotipos durante la etapa previa a floración, presentando la línea *WT* similares valores de biomasa que la *phyB1* (Fig. 3.2 y 3.3). A partir de floración (Exp.2) y durante la post-floración (Exp.1 y 2) ambas líneas redujeron su crecimiento en alta densidad ($p: 0.004$ en Exp.1 y $p: 0.028$ Exp.2) alcanzando la *WT* una mayor biomasa final ($p: 0.01$ y $p: 0.107$ para Exp.1 y 2; respectivamente) tanto en alta como en baja densidad de siembra.

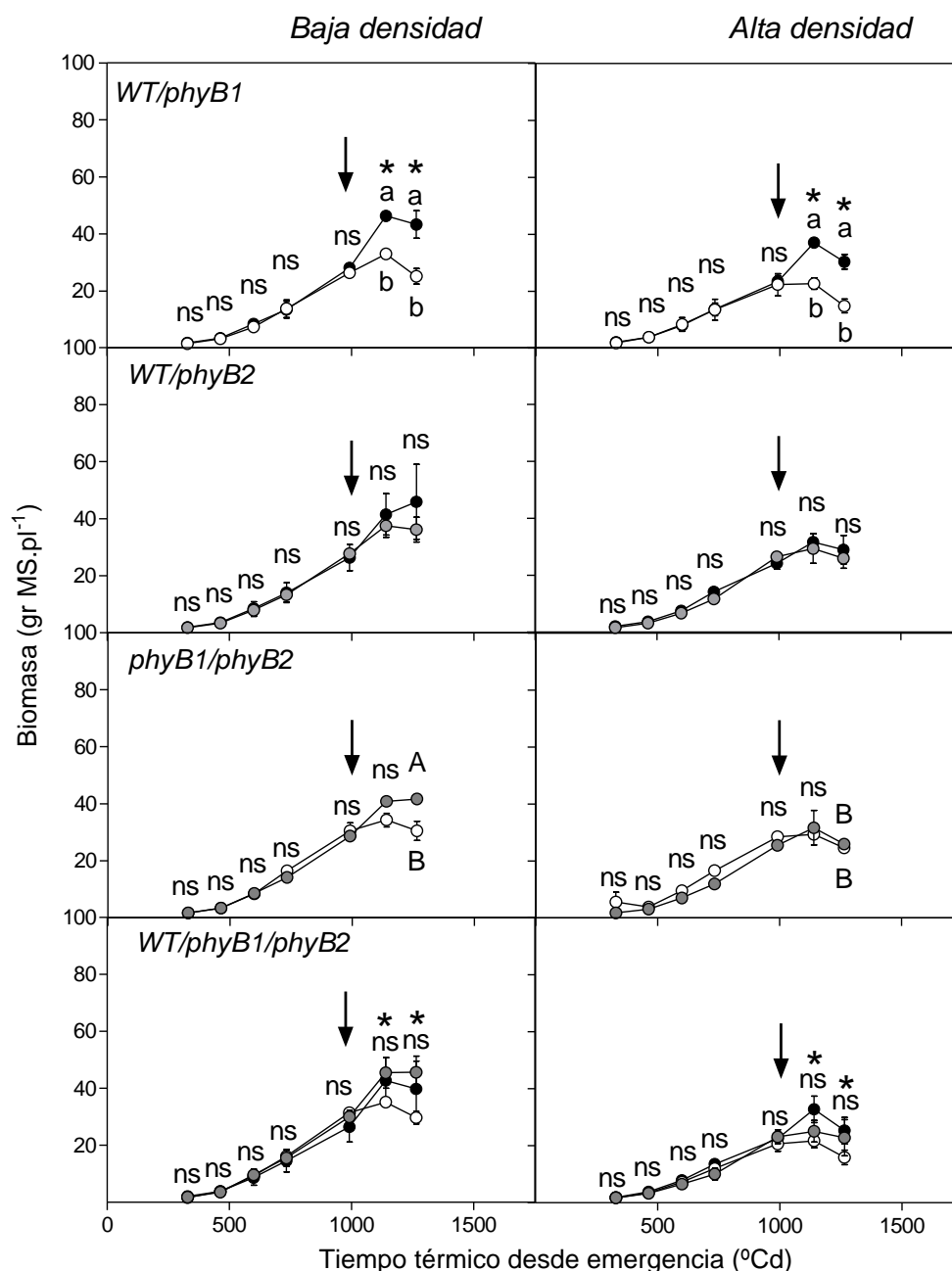


Figura 3.2. Experimento 1, evolución de la biomasa de las plantas de la línea endo-criada France 2 en su versión WT (círculos negros), *phyB1* (círculos blancos) y *phyB2* (círculos grises) creciendo en poli-culturas (WT/*phyB1*, WT/*phyB2*, *phyB1/phyB2* y WT/*phyB1/phyB2*) en baja (primer columna de gráficos) y alta densidad de siembra (segunda columna). Las flechas indican momento de floración, las barras en cada punto indican el error estándar, y los * el efecto simple de la densidad de siembra. Letras minúsculas permiten comparar los efectos simples del genotipo y las letras mayúsculas la interacción entre densidades y genotipos ($p < 0.05$, test de Tukey).

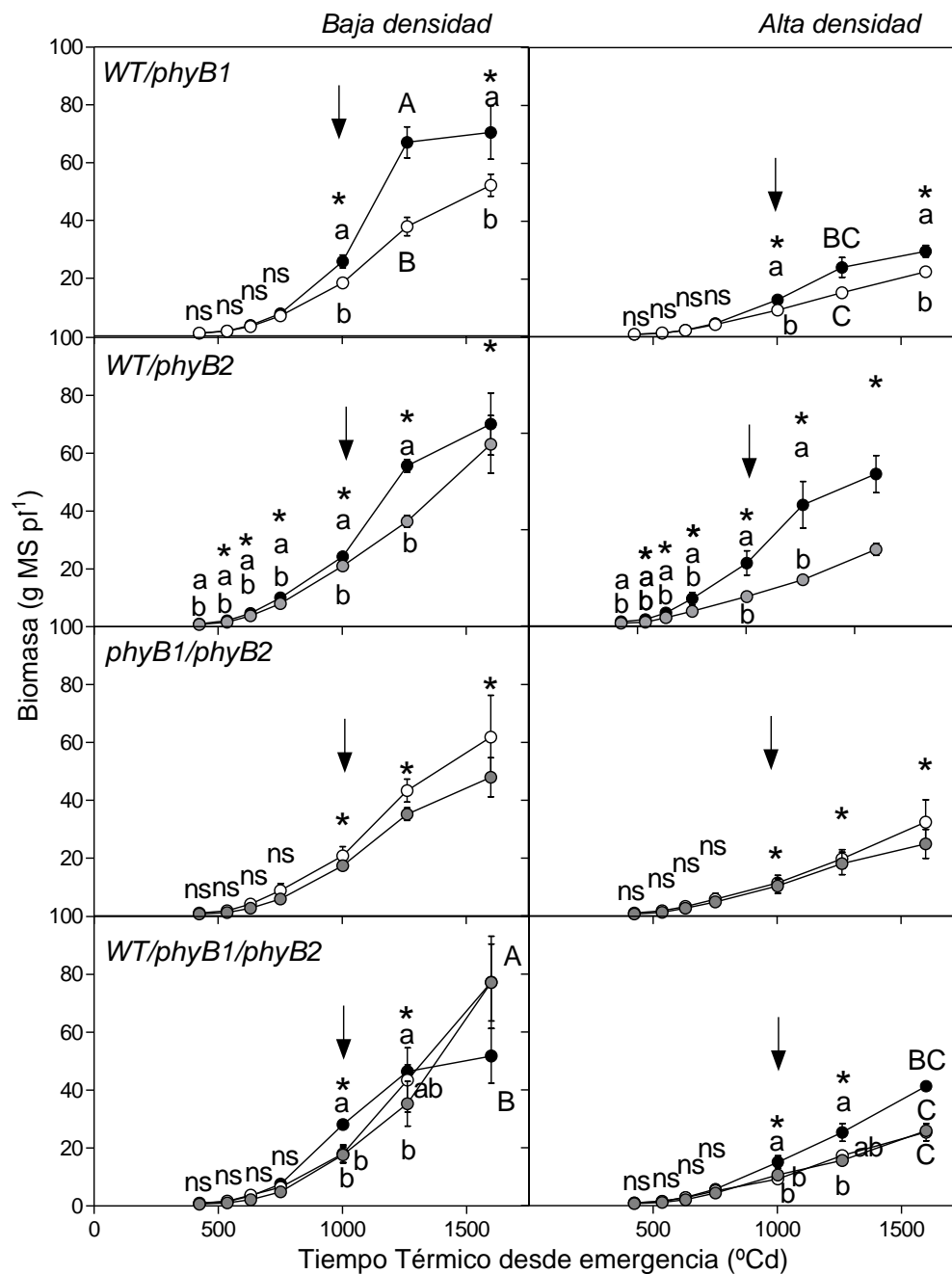


Figura 3.3. Experimento 2, evolución de la biomasa de las plantas de la línea endo-criada France 2 en su versión WT (círculos negros), *phyB1* (círculos blancos) y *phyB2* (círculos grises) creciendo en poli-culturas (WT/*phyB1*, WT/*phyB2*, *phyB1/phyB2* y WT/*phyB1/phyB2*) en baja (primer columna de gráficos) y alta densidad de siembra (segunda columna). Las flechas indican momento de floración, las barras en cada punto indican el error estándar, y los * el efecto simple de la densidad de siembra. Letras minúsculas permiten comparar los efectos simples del genotipo y las letras mayúsculas la interacción entre densidades y genotipos ($p < 0.05$, test de Tukey).

Cuando se cultivó a la línea WT con la *phyB2*, ambos genotipos en el Exp.1 no redujeron su crecimiento en respuesta a la densidad y exhibieron similares valores de biomasa (Fig.3.2). Por

el contrario en el Exp2. (Fig. 3.3), la *WT* presentó un mayor crecimiento que la *PhyB2* desde etapas tempranas (V_5 , 350°Cd, p : 0.001) tanto en alta como en baja densidad de siembra, detectándose también tempranamente el efecto de la densidad de siembra (p : 0.013).

Las líneas mutantes en poli-cultura no disminuyeron su crecimiento en respuesta a la densidad en el Exp.1 y sólo la biomasa a madurez fisiológica de la *phyB2* superó a la de *phyB1* (Fig. 3.2,) en baja densidad de siembra (p : 0.032). En el Exp. 2, ambas líneas presentaron similares valores de biomasa, reduciendo su crecimiento en respuesta al incremento de la densidad (p : 0.058) en la etapa post-floración (Fig. 3.3).

Finalmente, en la poli-cultura con las tres líneas, el incremento de la densidad de siembra redujo el crecimiento de las plantas en post-floración (p : 0.029 y p : 0.036 para Exp.1 y 2, respectivamente), sin diferenciarse los genotipos en su biomasa en el Exp.1 (Fig. 3.2). En el Exp.2, las mayores variaciones de biomasa entre densidades las exhibieron las líneas mutantes (Fig. 3.3). Así en madurez fisiológica presentaron mayor biomasa que la *WT* en baja densidad (p : 0.002), mientras que en alta densidad resultaron similares.

3.3.3. Altura y área foliar

Las diferencias genotípicas en el crecimiento individual de cada planta fueron coincidentes con lo observado en el largo de los tallos y el área foliar de las plantas en R_1 (Tabla 3.1A, B). En los dos experimentos, cuando las plantas *WT* crecieron con las *phyB1* resultaron entre un 9 % (baja densidad) y un 10% (alta densidad) más altas. También presentaron mayor área foliar tanto en baja (32% superior) como en alta (24% superior) densidad de siembra. De la misma manera las *WT* cultivadas con las *phyB2* presentaron tallos más altos especialmente en alta densidad (2.5% y 14% superior en baja y alta densidad de siembra, respectivamente) y mayor área foliar en ambas densidades (27% y 22% superior en baja y alta densidad de siembra, respectivamente).

En el inter-cultivo *phyB1/phyB2* no se detectaron diferencias significativas en la altura de las mutantes en ambos experimentos (Tabla 3.1A, B), en tanto que el área foliar sólo resultó levemente mayor en las *phyB2* del Exp.1 (ca. 8% y 10% en baja y alta densidad de siembra, respectivamente).

Experimento	Densidad	Poli-cultura	Genotipo	Área foliar (cm ⁻²)	<i>p</i> -valor	Altura de tallo (cm)	<i>p</i> -valor
1	<i>Baja</i>	<i>WT/phyB1</i>	<i>WT</i>	1291,59	0,073	74,6	0,049
			<i>phyB1</i>	784,91		67,5	
		<i>WT/phyB2</i>	<i>WT</i>	1315,65	0,066	72,8	0,09
			<i>phyB2</i>	932,26		71,2	
		<i>phyB1/phyB2</i>	<i>phyB1</i>	904,97	0,068	83,8	ns
			<i>phyB2</i>	977,99		80,4	
		<i>WT/phyB1/phyB2</i>	<i>WT</i>	1200,85	ns	70,0	ns
			<i>phyB1</i>	970,97		68,7	
			<i>phyB2</i>	1051,03		73,9	
	<i>Alta</i>	<i>WT/phyB1</i>	<i>WT</i>	935,87	0,073	84,8	0,049
			<i>phyB1</i>	771,25		78,9	
		<i>WT/phyB2</i>	<i>WT</i>	941,06	0,066	91,1	0,09
			<i>phyB2</i>	820,01		81,7	
		<i>phyB1/phyB2</i>	<i>phyB1</i>	866,08	0,068	73,4	ns
			<i>phyB2</i>	954,38		68,2	
		<i>WT/phyB1/phyB2</i>	<i>WT</i>	1194,20	ns	77,5	ns
			<i>phyB1</i>	810,38		78,1	
			<i>phyB2</i>	858,28		72,9	

Tabla 3.1. A. Área foliar por planta (cm⁻²) y altura de tallos (cm) en floración para la línea France 2 (*WT*) y sus respectivos mutantes de fitocromo B, (*phyB1* y *phyB2*) cultivados en policulturas (*WT/phyB1*, *WT/phyB2*, *phyB1/phyB2* y *WT/phyB1/phyB2*) en baja y alta densidad de siembra en la campaña 2009/10 (Experimento 1). El *p*-valor, indica diferencias significativas del efecto simple del genotipo dentro de cada poli-cultura.

Experimento	Densidad	Poli-cultura	Genotipo	Área foliar (cm ⁻²)	p-valor	Altura de tallo (cm)	p-valor
2	Baja	WT/phyB1	WT	1414,69	0,01	88,8	0,029
			phyB1	1066,61		84,0	
		WT/phyB2	WT	1376,01	0,002	88,8	0,001
			phyB2	1047,48		86,2	
		phyB1/phyB2	phyB1	1070,99	ns	82,1	ns
			phyB2	927,35		84,6	
		WT/phyB1/phyB2	WT	1388,13	0,026	89,4	0,017
			phyB1	1113,11		81,1	
			phyB2	897,96		73,0	
	Alta	WT/phyB1	WT	1256,68	0,01	92,5	0,029
			phyB1	877,97		86,1	
		WT/phyB2	WT	1040,74	0,002	92,5	0,001
			phyB2	720,02		77,1	
		phyB1/phyB2	phyB1	966,88	ns	85,9	ns
			phyB2	912,4		76,7	
		WT/phyB1/phyB2	WT	1229,3	0,026	97,3	0,017
			phyB1	814,07		83,0	
			phyB2	972,1		83,9	

Tabla 3.1.B. Área foliar por planta (cm⁻²) y altura de tallos (cm) en floración para la línea France 2 (WT) y sus respectivos mutantes de fitocromo B, (*phyB1* y *phyB2*) cultivados en poli-culturas (WT/*phyB1*, WT/*phyB2*, *phyB1/phyB2* y WT/*phyB1/phyB2*) en baja y alta densidad de siembra en la campaña 2011/12 (experimento 2). El *p-valor*, indica diferencias significativas del efecto simple del genotipo dentro de cada poli-cultura.

Por último en el inter-cultivo con los tres genotipos del Exp.2 las *WT* alcanzaron una mayor altura de tallos (ca. 17%) y mayor área foliar (ca. 37%) que las mutantes en las dos densidades de siembra (Tabla 3.1.A ,B).

Resumiendo, la mayor altura y área foliar de las *WT* creciendo con las mutantes se vieron en general reflejadas en el mayor crecimiento de las plantas observado en etapas avanzadas del ciclo (pos-floración en el Exp.1, Fig.3.2 y desde floración en el Exp.2, Fig.3.3).

3.3.4. Tasa de crecimiento alrededor de floración de las plantas de cada genotipo en las poli-culturas

En general, durante los dos experimentos las tasas de crecimiento por planta durante el período crítico de todos los genotipos en poli-culturas se vieron reducidas significativamente por el aumento en la densidad de siembra (Figs. 3.4 y 3.5). Sólo en la poli-cultura *phyB1/phyB2* del Exp.1 las diferencias no resultaron significativas. En ambas densidades y experimentos la línea *WT* presentó mayores tasas de crecimiento que la *phyB1* (*WT/phyB1*; p: 0.001 y p: 0.09 para Exp.1 y 2, respectivamente) y la *phyB2* (*WT/phyB2*) aunque en esta última poli-cultura las diferencias resultaron significativas (p: 0.045) en el Exp1.

En la poli-cultura de ambas mutantes (*phyb1/phyB2*) del Exp.1, *phyB2* alcanzó las mayores tasas de crecimiento (p: 0.055; Fig. 3.4), mientras que en el Exp.2 no se detectaron diferencias significativas (Fig. 3.5). En la poli-cultura donde crecieron las tres líneas (*WT/phyB1/phyB2*) la línea *phyB1* presentó menores tasas de crecimiento (p: 0.016) que la *WT* sólo en el Exp.1 (Fig. 3.4).

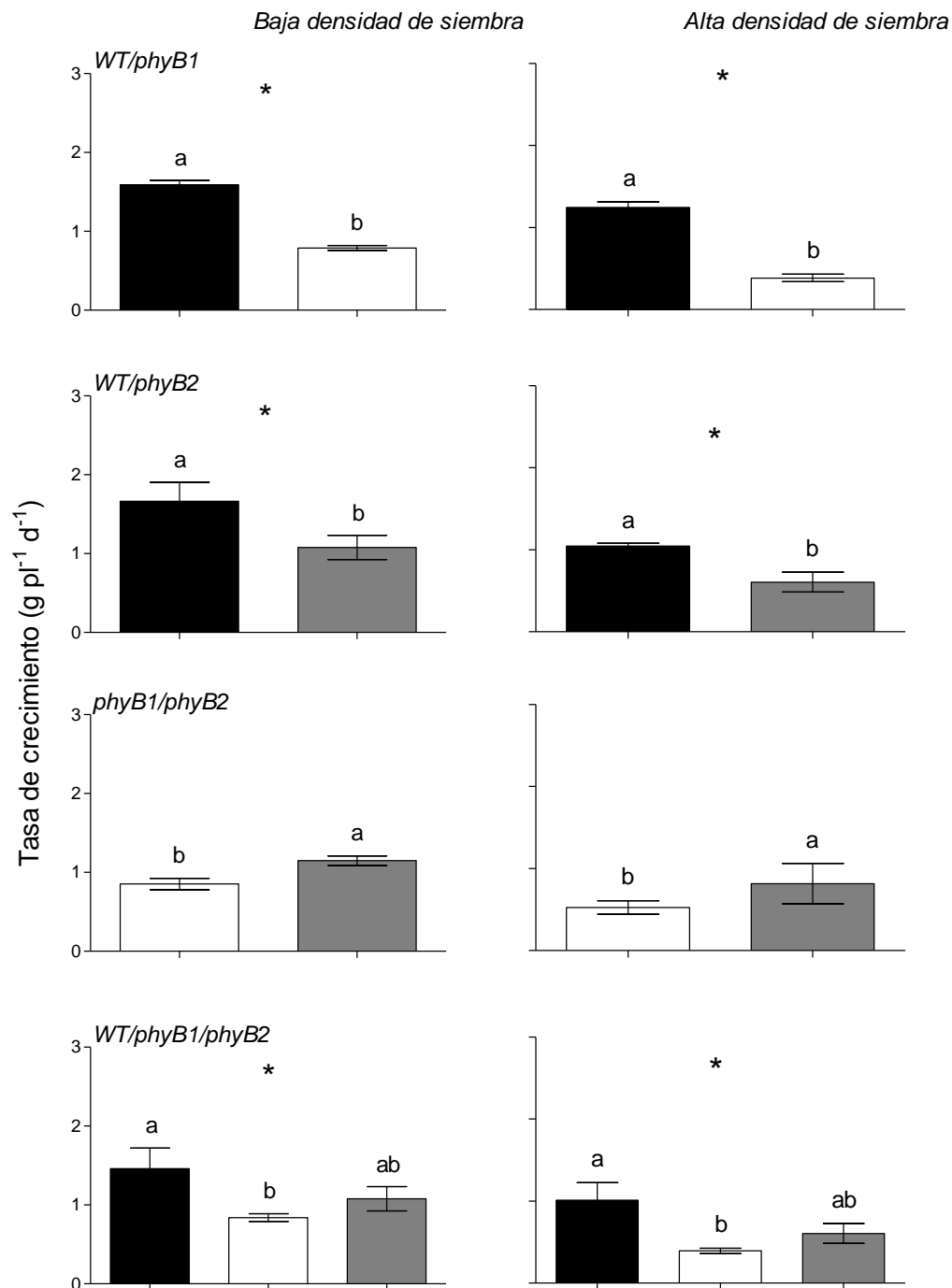


Figura 3.4. Experimento 1; tasa de crecimiento de las plantas durante el período crítico (± 15 días a floración) de la línea endo-criada France 2, (WT, columnas negras) y sus respectivos mutantes de fitocromo B, *phyB1* (columnas blancas) y *phyB2* (columnas grises) creciendo en poli-culturas (WT/*phyB1*, WT/*phyB2*, *phyB1/phyB2* y WT/*phyB1/phyB2*) en baja (primer columna de gráficos) y alta densidad de siembra (segunda columna). Las barras en cada columna indican el error estándar, los * el efecto simple de la densidad de siembra y las letras minúsculas el efecto simple del genotipo.

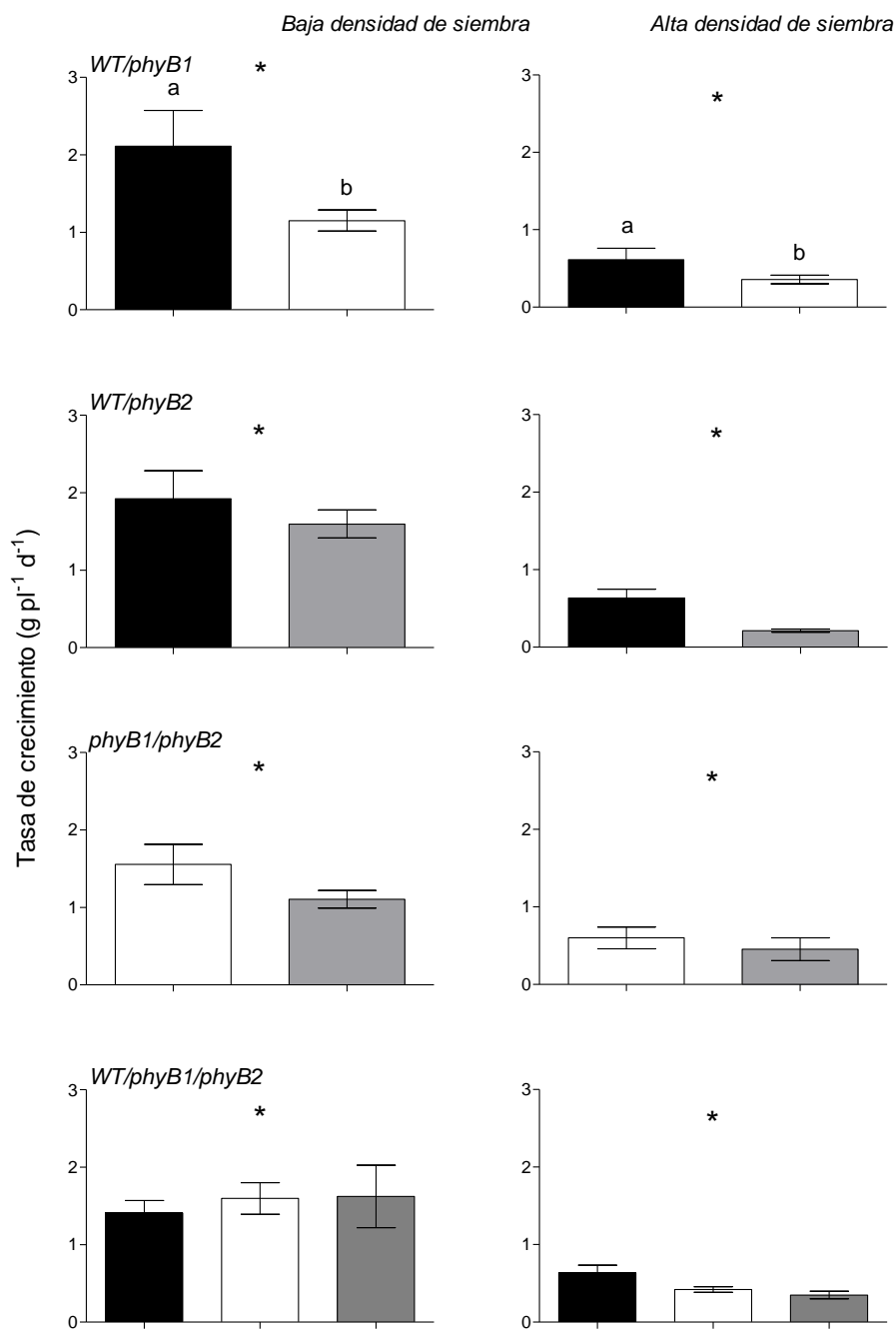


Figura 3.5. Experimento 2; tasa de crecimiento de las plantas durante el período crítico (± 15 días a floración) de la línea endo-criada France 2, (WT, columnas negras) y sus respectivos mutantes de fitocromo B, *phyB1* (columnas blancas) y *phyB2* (columnas grises) creciendo en poli-culturas (WT/*phyB1*, WT/*phyB2*, *phyB1/phyB2* y WT/*phyB1/phyB2*) en baja (primer columna de gráficos) y alta densidad de siembra (segunda columna). Las barras en cada columna indican el error estándar, los * el efecto simple de la densidad de siembra y las letras minúsculas el efecto simple del genotipo.

3.3.5. Rendimiento por unidad de superficie de poli-culturas vs. mono-culturas, contribución al rendimiento de cada genotipo en las poli-culturas y LER

Durante el Exp.1., se detectó una interacción significativa cultura x densidad de siembra ($p: 0.08$) sobre el rendimiento por unidad de superficie (Fig.3.6; Exp.1). Sólo la mono-cultura *phyB2* y las poli-culturas *WT/phyB1*, *WT/phyB2* y *phyB1/phyB2* incrementaron su rendimiento en respuesta a la mayor densidad de siembra, alcanzando mayores rendimientos que las mono-culturas de *WT* y *phyB1*. En el Exp.2, ninguna cultura incrementó su rendimiento en respuesta a la densidad de siembra, y entre las mono-culturas la *phyB1* alcanzó los menores rendimientos (Fig. 3.6; Exp.2). Cuando *phyB1* fue cultivada junto con *phyB2* (*phyB1/phyB2*) o con *WT* y *phyB2* (*WT/phyB1/phyB2*) el rendimiento resultó superior a su mono-cultura. La alta variabilidad entre parcelas principales no permitió detectar el efecto positivo de la presencia de *phyB2* en el rendimiento de las poli-culturas en alta densidad de siembra con respecto a la mono-cultura *WT*.

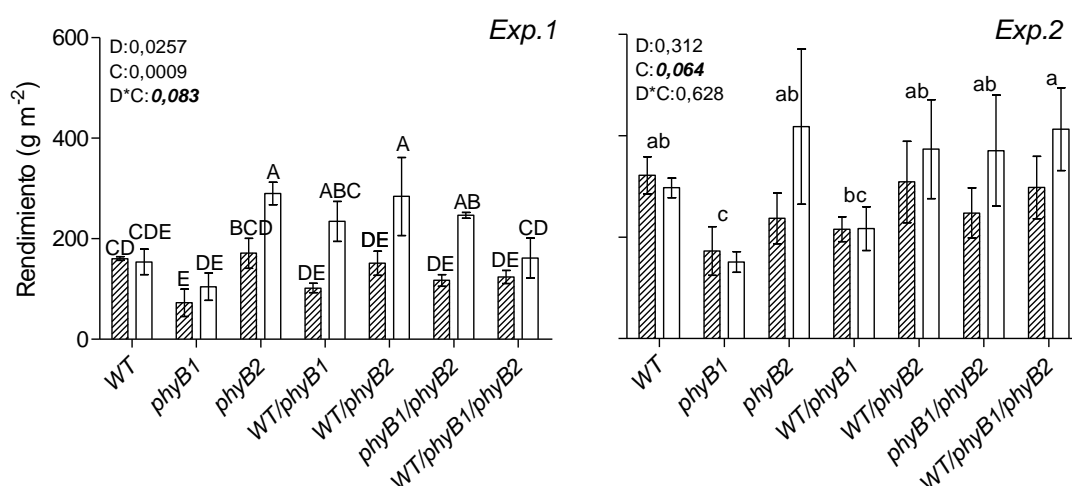


Figura 3.6. Rendimiento (g m⁻²) para las mono-culturas (*WT*, *phyB1*, *phyB2*) y poli-culturas (*WT/phyB1*, *WT/phyB2*, *phyB1/phyB2* y *WT/phyB1/phyB2*) en las campañas 2009-10 (Exp. 1) y 2011-12 (Exp.2) creciendo en baja (columnas rayadas) y alta densidad de siembra (columnas blancas). Las barras en cada columna indican el error estándar de las medias, las letras minúsculas el efecto simple de la cultura (C) y las mayúsculas el efecto de la interacción entre la cultura y la densidad de siembra (D) (Test LSD Fisher 5%). Se adjunta la significancia de cada factor y de la interacción entre factores.

El rendimiento promedio de los individuos de cada genotipo identificado en cada poli-cultura afectado por su proporción según la densidad de siembra, permitió cuantificar su contribución al rendimiento total de la mezcla (Fig. 3.7).

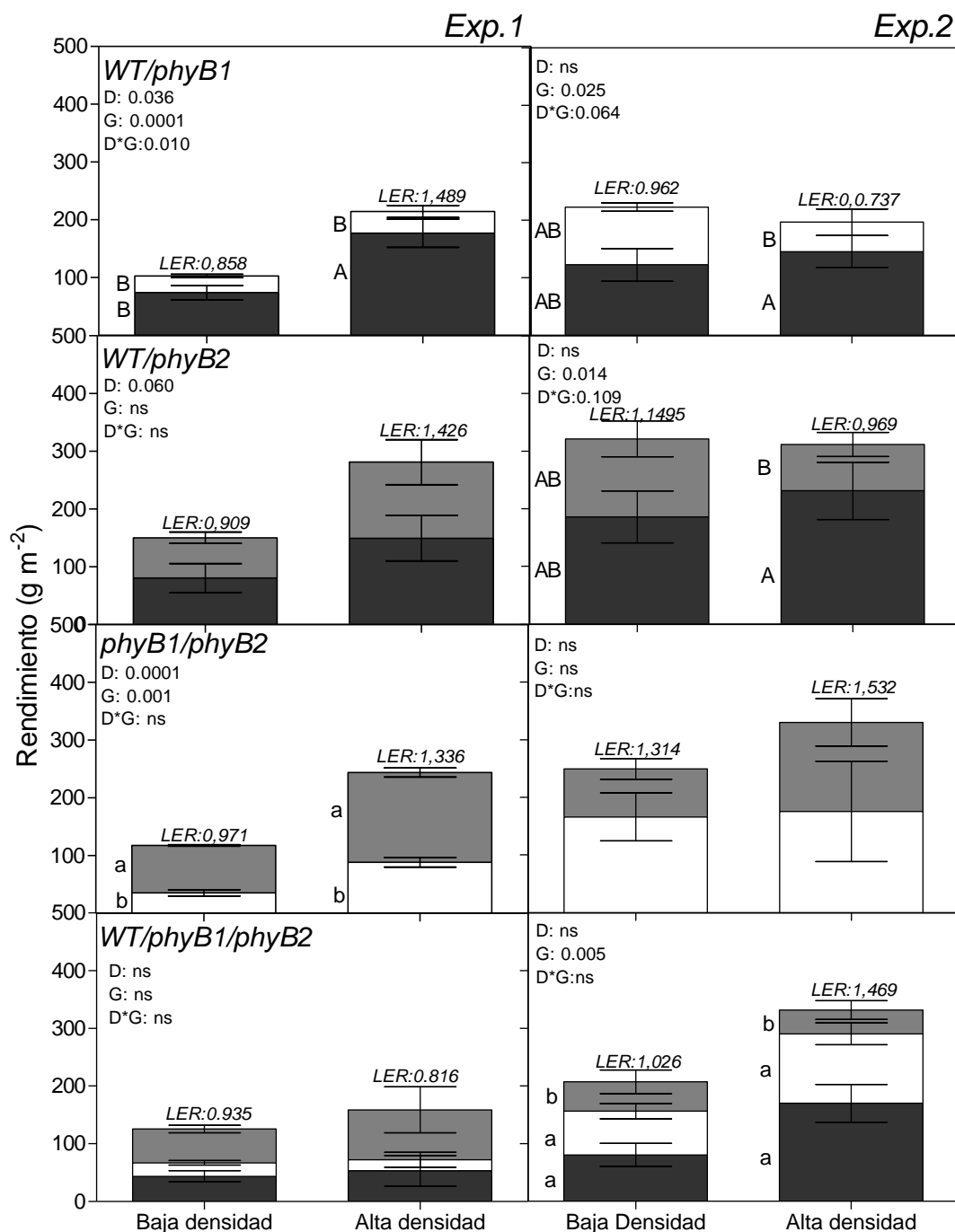


Figura 3.7: Rendimiento (g m^{-2}) de las poli-culturas (*WT/phyB1*, *WT/phyB2*, *phyB1/phyB2* y *WT/phyB1/phyB2*) de la línea endo-criada France 2, (*WT*, columnas negras) y sus respectivos mutantes de fitocromo B (*phyB1*, columnas blancas y *phyB2*, columnas grises) en baja (columnas de la izquierda) y alta densidad de siembra (columnas de la derecha) para las campañas 2009-10 (Exp.1) y 2011-12 (Exp.2). Barras en cada columna indican error estándar. Letras minúsculas indican, efecto simple del genotipo (G) y mayúsculas la interacción entre la densidad de siembra (D) y el genotipo. Sobre cada columna se indica el LER de cada poli-cultura.

En la poli-cultura *WT/phyB1* de ambos experimentos y en baja densidad de siembra, ambos genotipos contribuyeron por igual al rendimiento de la mezcla. Por el contrario en alta densidad, el rendimiento de *WT* fue significativamente mayor al de *phyB1* (p : 0.010 y 0.050, para Exp.1 y Exp.2, respectivamente), mostrando congruencia con su mayor biomasa individual (Figs. 3.2 y 3.3). En la poli-cultura *WT/phyB2* del Exp.1 ambos genotipos en ambas densidades, contribuyeron por igual al rendimiento por unidad de superficie, mientras que en el Exp. 2 el rendimiento de la *WT* resultó superior al de la *phyB2* (p : 0.010) en alta densidad, coincidiendo con su mayor crecimiento individual (Figs. 3.2 y 3.3). Cuando *phyB1* y *phyB2* crecieron juntas (*phyB1/phyB2*) durante el Exp.1, el rendimiento de *phyB2* fue significativamente mayor al de *phyB1* (p : 0.001) tanto en baja como en alta densidad de siembra, mientras que en el Exp.2 no hubo diferencias significativas entre los componentes. Por último en la poli-cultura *WT/phyB1/phyB2* del Exp.1, los tres genotipos contribuyeron por igual al rendimiento en ambas densidades, mientras que en el Exp. 2 *WT* y *phyB1* rindieron significativamente más que *phyB2* en las dos densidades de siembra (p : 0.005).

La evaluación del rendimiento de las componentes en poli-culturas con respecto a las mono-culturas (cálculo del LER) permitió esclarecer si plantas con mayor o menor habilidad competitiva creciendo conjuntamente representó una ventaja o no respecto a cultivos compuestos por plantas con igual habilidad competitiva (Fig. 3.7). En baja densidad, es decir con casi nula competencia intra-específica, tanto en el Exp.1 como en el Exp.2 los valores de LER fueron cercanos a 1. Es decir, que el rendimiento de cada genotipo en la poli-cultura resultó proporcional a su participación en la mezcla. En alta densidad de siembra (situación de alta competencia) la estación de crecimiento de cada experimento condicionó la respuesta del LER de las poli-culturas. En el Exp.1 con una estación de crecimiento más corta (fecha de siembra de mediados de Enero) y con individuos de menor biomasa individual (Fig. 3.2), las poli-culturas *WT/phyB1*, *WT/phyB2* y *phyB1/phyB2* presentaron LER mayores a 1 (Fig.3.7). Para la poli-cultura *WT/phyB1*, este incremento del LER fue por aumento en el RR de *WT* y por una disminución del RR de *phyB1* (caso c, ver materiales y métodos). En el caso de *WT/phyB2* también hubo un aumento del RR de *WT* mientras que el RR de *phyB2* no disminuyó (≈ 0.5 , caso b). En la poli-cultura *phyB1/phyB2* el aumento del LER fue por un aumento del RR de *phyB1* (≈ 0.8) en tanto que el RR *phyB2* no se modificó (≈ 0.5 , caso c).

En el Exp.2, la estación de crecimiento fue más prolongada (fecha de siembra de mediados de Noviembre) y los individuos presentaron mayor biomasa individual (Fig. 3.3). En la alta densidad de siembra solo las poli-culturas *phyB1/phyB2* y *WT/phyB1/phyB2* incrementaron su LER (1.53 y 1.46, respectivamente) a través de un $RR > 0.5$ del *phyB1* y un $RR < 0.5$ del *phyB2*

(caso c) en *phyB1/phyB2*, o un RR cercano a 0.5 del WT, $RR > 0.5$ en *phyB1* y $RR < 0.5$ en *phyB2* en *WT/phyB1/phyB2*.

3.4. Discusión

La estructura rectangular de siembra de un cultivo de maíz (i.e. plantas creciendo muy próximas en la hilera de siembra, pero distanciadas a 50-70cm de aquellas en las hileras contiguas) genera un ambiente heterogéneo en la cantidad y calidad de luz dentro del canopeo (Maddonni et al., 2002). Como consecuencia, las plantas reciben mayores proporciones de R desde el entresurco y altas reflexiones de RL de sus vecinas más próximas en la misma hilera (ver Capítulo 2). Estas variaciones en la calidad de luz son percibidas por las plantas como señales tempranas de la presencia de sus vecinas (Smith et al., 1990) y se ha especulado que los individuos dominantes de un canopeo de maíz son más sensitivos a esta señal (Maddonni y Otegui, 2004; Maddonni y Otegui, 2006).

Coincidentemente, las mediciones del crecimiento de las plantas de cada uno de los genotipos en mono-culturas en baja y alta densidad de siembra, dan fuertes evidencias de que ambos fitocromos B regulan la variabilidad poblacional originada por la competencia asimétrica del estrés por luz. La similar variabilidad poblacional (semejantes CV de las biomásas) de las mono-culturas *phyB1* y *phyB2* para densidades de siembra altamente contrastantes da sustento a esta afirmación. Por otro lado, en etapas tempranas del Exp.1 (condición de año más restrictiva para el crecimiento), los CVs de este rasgo tanto de las mono-culturas *WT* como de las *phyB1* y *phyB2* no mostraron incrementos previos a encañazón (Maddonni y Otegui, 2004; Pagano y Maddonni, 2007), mientras que los CVs de todos los genotipos del Exp.2 (condición de año menos restrictiva para el crecimiento) exhibieron el mismo incremento temprano descrito en híbridos comerciales de maíz (Maddonni y Otegui, 2004; Pagano y Maddonni, 2007). Es decir, aunque no existen evidencias para rechazar la hipótesis 1 (las mutaciones de los fitocromos B reducen la variabilidad poblacional del cultivo), ambos fitocromos parecerían tener un rol en el establecimiento temprano de jerarquías de plantas, siendo esta respuesta dependiente del tamaño de las plantas.

Adicionalmente en este capítulo se analizaron los posibles cambios en la habilidad competitiva de las plantas asociados a la distinta arquitectura de las mutantes respecto a las *WT* (ver Cap. 2). Para ello se sembraron poli-culturas con la misma proporción de plantas *WT* y sus mutantes (*WT/phyB1*; *WT/phyB2*; *WT/phyB1/phyB2*) y entre ambas mutantes (*phyB1/phyB2*). En las poli-culturas de las líneas mutantes con su iso-línea con fitocromos activos (*WT/phyB1* y *WT/phyB2*), *phyB1* resultó menos hábil competidora que *WT* en la

captura de luz, ya que presentó una menor altura de tallo y menor área foliar, repercutiendo en su crecimiento y biomasa final. Similarmente, durante el Exp. 2 las plantas *phyB2* resultaron suprimidas (menor crecimiento y biomasa) por las *WT*, debido a su menor altura y área foliar. En consecuencia, ambas líneas en poli-cultura con la *WT* resultaron menos hábiles competidoras en la captura de luz, mientras que cuando se cultivaron conjuntamente (*phyB1/phyB2*) presentaron un similar comportamiento (i.e. igual biomasa individual y altura de tallos) en el Exp1 o *phyB1* una mayor habilidad competitiva que *phyB2* en el Exp.2. Finalmente en la poli-cultura con los 3 genotipos, *WT* presentó mayor habilidad competitiva que las mutantes en alta densidad de siembra. Si bien existen varios antecedentes del impacto del tamaño de un individuo en una comunidad o población sobre la determinación de asimetrías en la competencia por luz (Schwinning, 1996; Vega y Sadras, 2003), los resultados de este capítulo ponen en evidencia que las mutaciones de los fitocromos B afectan la competencia intra-específica en canopeos de individuos con similar fondo genético (iso-líneas) a través de su impacto sobre la arquitectura de las plantas. Es decir que la primer parte de la hipótesis 2 (en poli-culturas las plantas *WT* resultarán más hábiles competidoras que las mutantes de fitocromos B) tampoco es rechazada, sugiriendo además que ambos PhyB regulan la habilidad competitiva por luz de las plantas de maíz en condiciones de cultivo.

La segunda parte de la hipótesis 2, planteaba que las diferentes tasas de crecimiento de los distintos componentes de las poli-culturas durante el período crítico para la fijación de granos, podrían generar penalidades en el rendimiento del lote, debido a la relación curvi-lineal entre la tasa de crecimiento y el número de granos por planta (Andrade y Abbate, 2005). Sin embargo, estas penalidades no se registraron, ya que en el Exp.1 en alta densidad de siembra (i.e. alta presión de competencia), las poli-culturas *WT/phyB1*, *WT/phyB2* y *phyB1/phyB2* alcanzaron mayores niveles de rendimiento que la mono-cultura *WT*. En el Exp.2 se observó una tendencia similar la cual no resultó significativa debido a la alta variabilidad entre parcelas principales. Consecuentemente, si bien la diferencia entre experimentos no permite afirmar que el cultivo mixto de *WT* con sus mutantes repercuta positivamente sobre el rendimiento, la información obtenida si permite rechazar la segunda parte de la hipótesis 2, ya que ninguna de las poli-culturas en los dos experimentos alcanzaron menores rendimientos con respecto a la mono-cultura *WT*, i.e. la ausencia de fitocromos activos no significó una penalidad en el rendimiento (Boccalandro et al., 2003).

Para visualizar la contribución de cada componente de las poli-culturas al rendimiento del lote, se analizaron los rendimientos individuales de cada genotipo en la mezcla (Fig. 3.9). En alta densidad de siembra el componente más competitivo de las mezclas (i.e. *WT*) produjo un mayor rendimiento que los menos hábiles competidores (i.e. *phyB1* y *phyB2*). Para esclarecer

las relaciones funcionales entre estos componentes, se estimaron los RR de cada genotipo en las poli-culturas respecto a su par en mono-cultura, resumiéndolos en el valor de LER (Snaydon y Satorre, 1989). En la Fig. 3.8 se representan los resultados de las poli-culturas, las líneas rectas unen RR de igual magnitud. Si los valores de RR de una poli-cultura resultan en un LER cercano a 1, ambos componentes en la mezcla experimentaron “competencia perfecta” ya que el incremento del RR del genotipo más hábil competidor, produjo una disminución proporcional en el RR del otro genotipo de menor habilidad competitiva. Por el contrario, si el LER de una poli-cultura se ubica por encima de la línea de 1, ambos componentes mantuvieron una relación funcional de “complementariedad”, principal relación de interés en los inter-cultivos (Fukai, 1993; Snaydon y Satorre, 1989). Cabe aclarar que éste análisis bi-variado no contempla más de dos componentes, es decir que la poli-cultura (*WT/phyB1/phyB2*) no fue incluida.

En ambos experimentos y en baja densidad de siembra, los LERs de *WT/phyB1* y *WT/phyB2* se ubicaron cercanos a la línea de competencia perfecta con valores de RR cercanos a 0.5 en ambos componentes. Consecuentemente, en estas poli-culturas no hubo ganancia o pérdida relativa de sus componentes al pasar de la mono-cultura a la poli-cultura debido a la baja intensidad de competencia (i.e., no se puso de manifiesto la distinta habilidad competitiva de cada genotipo). Los LER y RR de *phyB1/phyB2* del Exp1 en baja densidad presentaron una tendencia similar, mientras que en el Exp. 2 *phyB1* alcanzó un mayor RR que *phyB2*, aunque los datos de *phyB1* presentaron gran variabilidad entre repeticiones. En alta densidad de siembra, las relaciones funcionales dependieron de la estación de crecimiento (efecto del ambiente sobre las relaciones funcionales). En el Exp.1 con una estación más restrictiva e individuos más pequeños, las poli-culturas *WT/phyB1* y *WT/phyB2* evidenciaron una complementariedad de recursos, con RR cercanos a 1 en la línea *WT* (Ver en Figura 3.8, que ambos puntos, O y Δ, se ubican cercanos a 1 en el eje Y) y RR ca. 0.5 en las líneas mutantes (ver los puntos O y Δ cerca del 0.5 en el eje X). En éste experimento, la situación de la mezcla del *WT* con los mutantes resulto beneficiosa (LERs 1.48 y 1.42, para *WT/phyB1* y *WT/phyB2*; respectivamente), sugiriendo que los requerimientos de recursos de ambos componentes (nichos ecológicos) fueron los suficientemente diferentes (i.e. principio de producción competitiva; Vandermeer, 1989). Similarmente, en la poli-cultura *phyB1/phyB2* el componente más beneficiado fue el *phyB1* (RR cercano a 1), sin manifestar grandes cambios el *phyB2* entre mono y poli-culturas (RR cercano a 0.5), determinando un mayor LER de la mezcla (LER = 1.33).

En el segundo experimento, con una estación de crecimiento más prolongada e individuos de mayor tamaño, en alta densidad de siembra la presión de competencia por los recursos determinó que las relaciones funcionales establecidas en las poli-culturas sean en casi todos

los casos de competencia perfecta (i.e. LER cercanos a 1). Sólo para la poli-cultura *WT/phyB1* el LER resultó menor a 1, por una penalidad en el RR de *phyB1*.

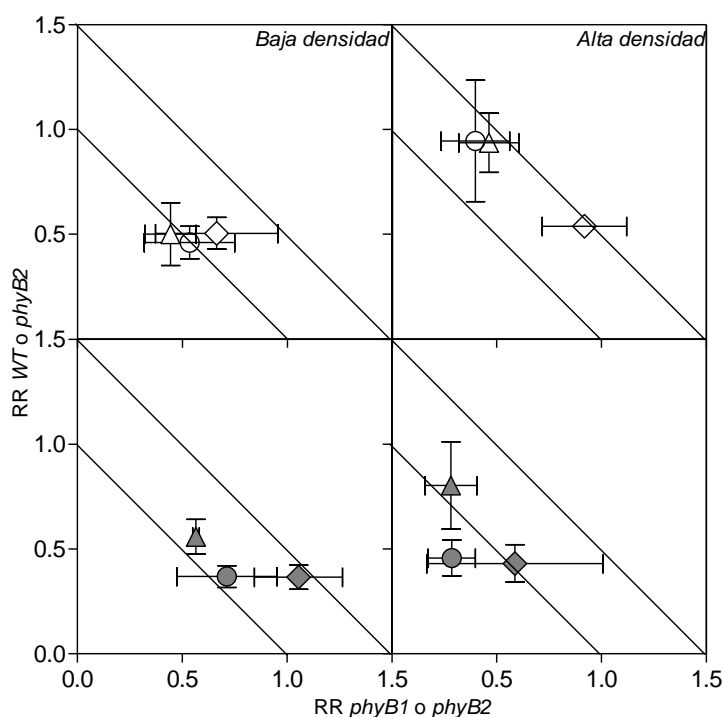


Figura 3.8. Rendimientos relativos de los genotipos *WT*, *phyB1* y *phyB2* en las poli-culturas *WT/phyB1* (O), *WT/phyB2* (Δ) y *phyB1/phyB2* (◇), en baja (primera columna) y alta (segunda columna) densidad de siembra para las campañas 2009-10 (símbolos blancos) y 2011-12 (símbolos grises). Para las poli-culturas *WT/phyB1* y *WT/phyB2*, *WT* se graficó en el eje Y y para las poli-culturas *phyB1/phyB2*, *phyB2* en el eje Y y *phyB1* en el X.

Resumiendo, los valores de LER obtenidos sugieren que cuando la presión competencia es baja (Exp. 1) y en alta densidad de siembra, las poli-culturas *WT/phyB1*, *WT/phyB2* y *phyB1/phyB2* resultaron más beneficiosas (LERs > 1) en términos de rendimiento (principio de producción competitiva; Vandermeer, 1989), que las mono-culturas. Cuando la presión de competencia fue alta (Exp.2), las poli-culturas se comportaron de manera similar que las mono-culturas (i.e. LERs cercanos a 1), con la única excepción de la mezcla *WT/phyB1* (RR por debajo de la línea 1:1 y LER = 0.73).

3.5 Conclusiones

En este capítulo se realizó una aproximación poblacional para analizar el comportamiento de un cultivo compuesto por individuos reactivos al estrés por densidad (*WT*) y otros con menor reactividad (*phyB1* y *phyB2*). El estudio temporal de la variabilidad poblacional en el crecimiento de las plantas y su impacto sobre la fijación de granos (Maddonni y Otegui, 2004;

Andrade y Abbate, 2005; Maddonni y Otegui, 2006; Pagano y Maddonni, 2007; Mayer et al., 2012) permitió identificar el rol de ambos fitocromos B en el establecimiento de variabilidad poblacional en mono-culturas, y que las mutaciones de estos fitocromos afectan la habilidad competitiva de las plantas en las poli-culturas, repercutiendo en su menor rendimiento en la mezcla. Por otro lado, la representación gráfica con un análisis Bi-variado de las especies en una poli-cultura (Fukai, 1993; Snaydon y Satorre, 1989) dejó de manifiesto que para algunas situaciones (baja presión de competencia) aunque las plantas mutantes sean menos hábiles competidoras que las *WT*, existieron situaciones de complementariedad espacial del recurso luz, que resultaron beneficiosas para la productividad de la mezcla.

Capítulo 4

Discusión General

4.1 Discusión General:

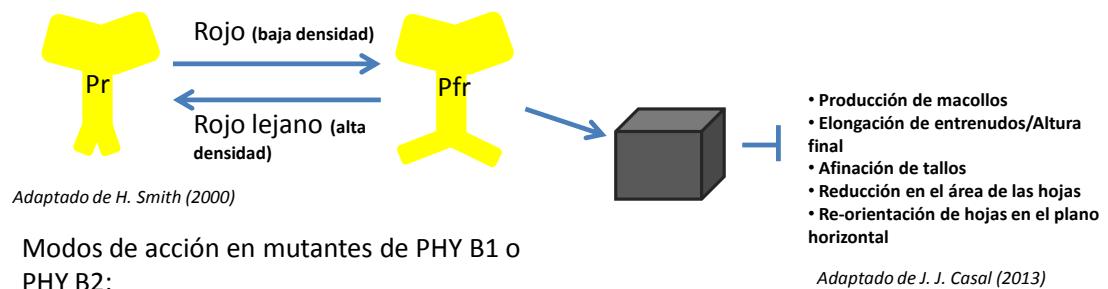
Hasta el momento existe un gran volumen de información acerca de cómo las plantas perciben el ambiente donde crecen y se desarrollan. El interés de conocer los mecanismos subyacentes de este proceso ha revelado que los fotorreceptores están involucrados en numerosos procesos que van desde la germinación hasta la floración de las plantas (Smith, 2000; Andrés y Coupland, 2012; Casal, 2012, 2013). Sin embargo, esta vasta información, en general proviene de experimentos en niveles de organización inferiores (moléculas, organelas, células, órganos) y con menos frecuencia de observaciones en plantas aisladas o cultivos y en mucho de estos trabajos se describen algunas respuestas sin vincularlas con su impacto agronómico. En consecuencia, existe una importante demanda de integrar estos mecanismos hacia niveles superiores ya que en algunos casos el salto de nivel (e.g. de órgano a planta) implica que las respuestas observadas en niveles inferiores no se reflejen en niveles superiores (Passioura y Angus, 2010).

Es por lo expuesto que en ésta tesis, se puso particular énfasis en tratar de describir los procesos foto-morfogénicos en distintos niveles de organización. Poder contar con multiplicación de semillas de una línea de maíz con mutaciones de los fitocromos B y su par con fitocromos activos (*WT*), permitió integrar estos procesos hasta el nivel de canopeo. A nivel de órgano, se describió la respuesta de hojas y tallos a los cambios en la calidad de la luz originados por densidades de siembra contrastantes. Al realizarse mediciones no destructivas de estos rasgos (i.e. modelos alométricos) a lo largo del ciclo, fue posible describir la evolución del crecimiento de cada planta (nivel de individuo) y su variabilidad (nivel de poblacional), para posteriormente interpretar el impacto de los fitocromos sobre los determinantes eco-fisiológicos de la producción de materia seca y el rendimiento de un cultivo. Esta aproximación experimental permitió poner a prueba el modelo teórico que predice las respuestas de los rasgos arquitecturales de las plantas de maíz a la calidad de luz (Esquema 1).

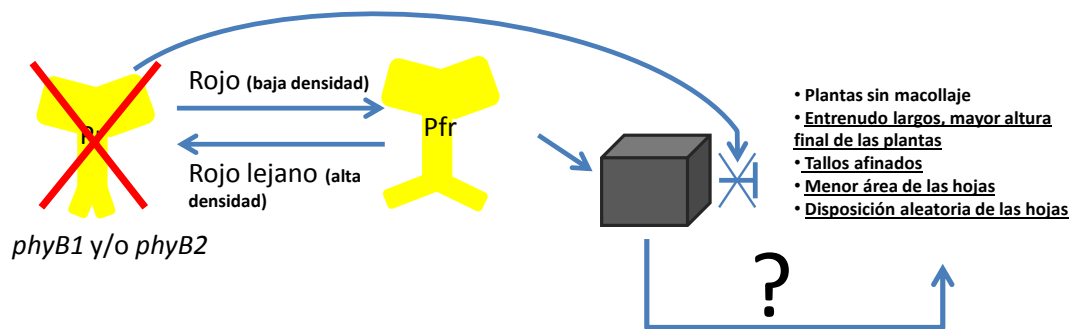
Así, a través del efecto de las mutaciones pudo identificarse el rol de cada fitocromo B sobre los rasgos arquitecturales de planta (Esquema 2), y su impacto sobre el crecimiento de los individuos y del cultivo (Esquema 3). Haber podido incluir la línea France 2 con la doble mutación (*phyB1-phyB2*) en los experimentos a campo hubiera esclarecido la redundancia o no de cada PhyB sobre todas las variables medidas.

Modelo propuesto.

Modo de acción *Wild Type*.

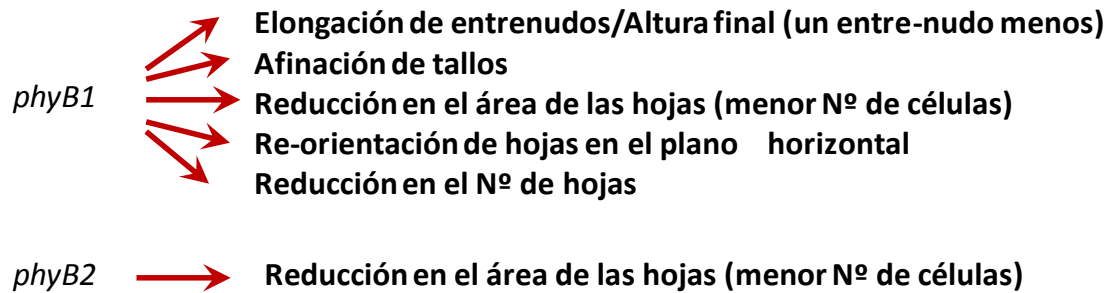


Modos de acción en mutantes de PHY B1 o PHY B2:

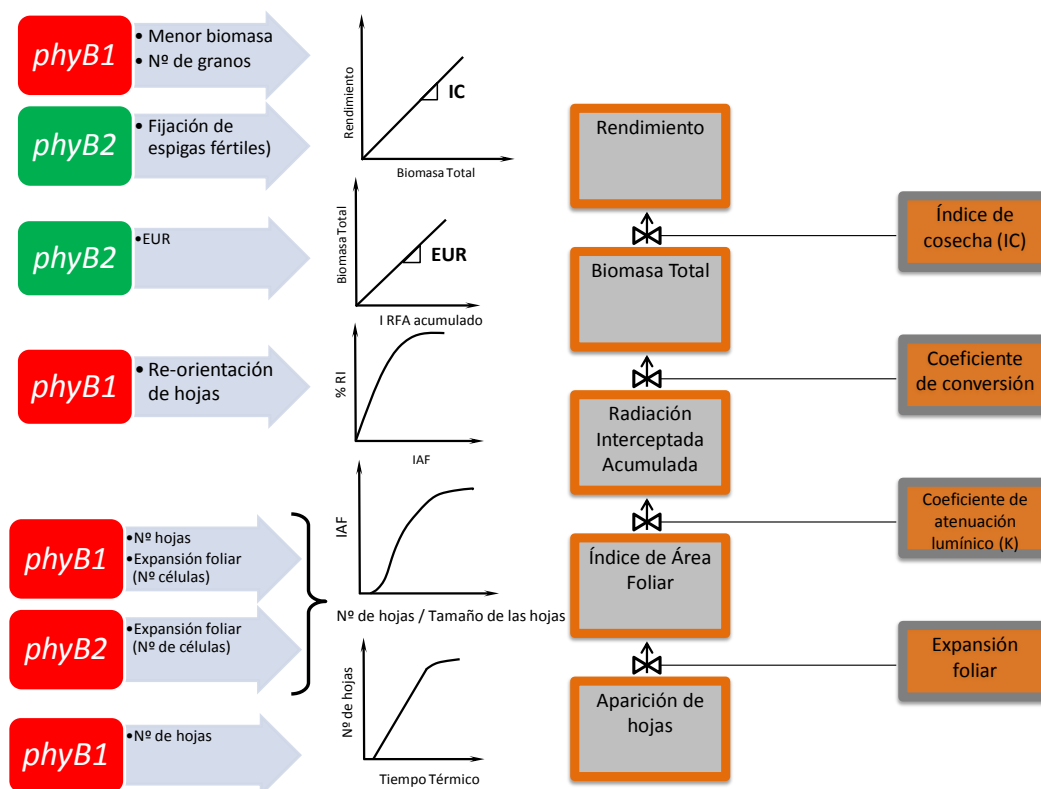


Esquema 1: Respuestas de los rasgos arquitecturales de las plantas de la línea de maíz France 2 y sus mutantes de fitocromos B. La forma activa Pfr de cualquiera de los dos fitocromos B inhibe las respuestas al síndrome de “evasión de sombra”. La caja negra indica el estado actual del conocimiento sobre las posibles vías de acción de los fitocromos (interactuando físicamente con los PIFs o con un dominio KINASA para desencadenar las respuestas transcripcionales).

Para predecir o interpretar el impacto del ambiente/variables de manejo sobre el rendimiento de un cultivo se ha utilizado ampliamente el modelo adaptado de Monteith y Moss (1977) y Evans (1993) (Esquema 3) en el cuál el ritmo de aparición de hojas de un cultivo en función del tiempo térmico define la cantidad de órganos capaces de interceptar RFA. Para una determinada cantidad de plantas, el número de hojas y su correspondiente expansión foliar determina el índice de área foliar (IAF). Este índice es responsable de la captura diaria de radiación (fRFA) que es transformada en biomasa según la EUR. Por último la biomasa total se particiona a los granos (rendimiento) a través del índice de cosecha (proporción de biomasa en granos con respecto a la biomasa total).



Esquema 2: Impacto de las mutaciones de los fitocromos B (*phyB1* y *phyB2*) sobre los rasgos arquitecturales de planta medidos en los Exp. 1 y 2.



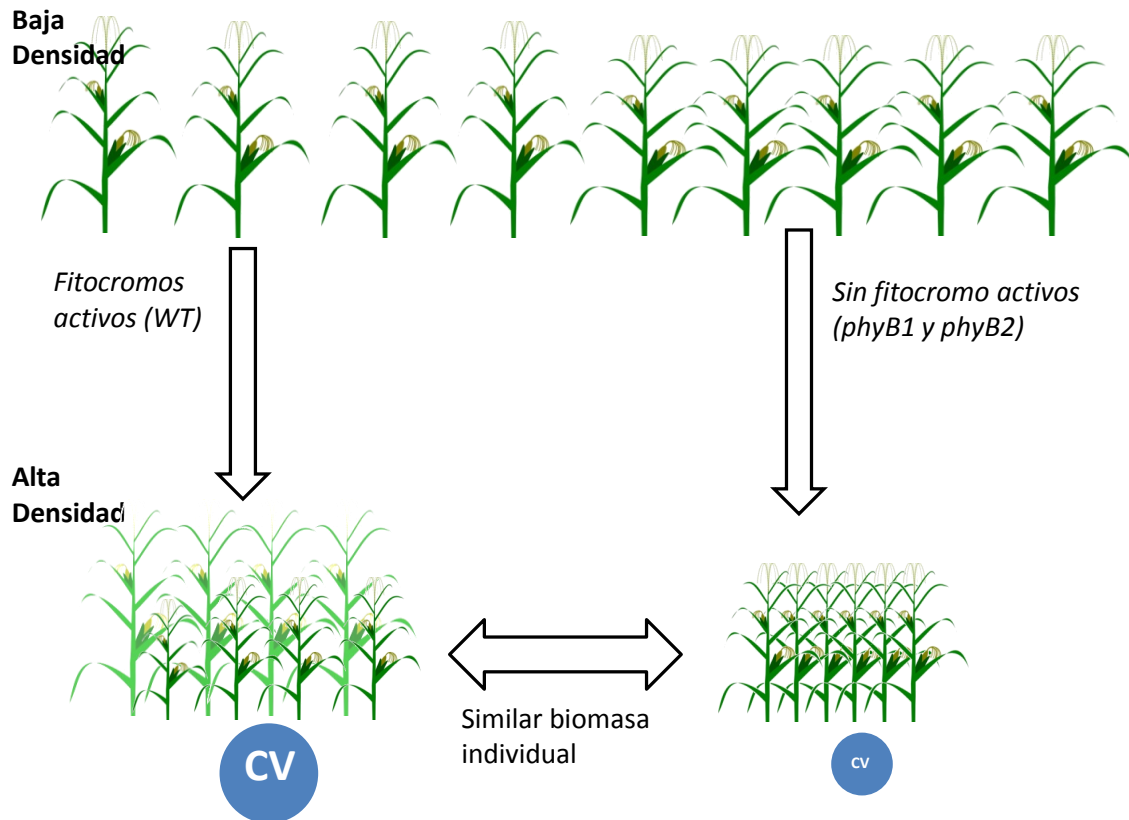
Esquema 3: Modelo predictivo del rendimiento de un cultivo a través de sus variables eco-fisiológicas adaptado de Monteith y Moss (1977) y Evans (1993). Las flechas celestes indican qué variables del modelo se modificaron positivamente (cartel verde) o negativamente (cartel rojo) por la mutación de cada fitocromo B (*phyB1* y *phyB2*).

Los rasgos evaluados a nivel de planta determinaron que la mutación de ambos fitocromos reduce el área foliar de las plantas (*phyB1* por un menor N° de hojas y una menor expansión foliar y *phyB2* sólo por menor expansión foliar); más aún se comprobó que la disminución de la expansión foliar fue originada por una menor división celular en el mesófilo de las láminas de las hojas. Esta reducción del área foliar de las plantas, junto con la

incapacidad en reorientación de las hojas del *phyB1*, presumiblemente determine una menor radiación interceptada por planta (variable imposible de estimar con exactitud en un canopeo) en las líneas mutantes y consecuentemente una penalidad en el crecimiento en comparación con las *WT*. A nivel de planta, ambas mutantes presentaron una menor tasa de crecimiento alrededor de floración respecto a la *WT* en baja densidad de siembra pero sólo *phyB1* produjo una menor biomasa y rendimiento total a nivel de cultivo en ambas densidades. Cuando se evaluó la EUR, llamativamente *phyB2* no redujo esta eficiencia cuando se incrementó la densidad de siembra (respuesta sí observada en las líneas *WT* y *phyB1*) determinando también una mayor tasa de crecimiento del cultivo y rendimiento (por mayor índice de fertilidad de espigas) que la *WT* en alta densidad. Debido a que la EUR sólo se registró en el segundo experimento, sería necesaria una mayor experimentación para dar más sustento a esta evidencia.

En resumen, la cuantificación de las variables de planta involucradas en la captura de radiación a nivel de cultivo mejoró el entendimiento de cómo los rasgos arquitecturales en respuesta a la densidad de siembra determinan la producción de biomasa y el rendimiento de un cultivo. En el capítulo siguiente (Capítulo 3), se analizó cómo la ausencia de foto-receptores activos influencia la dinámica del establecimiento de jerarquías entre plantas (competencia intra-específica); principal proceso que define el éxito reproductivo de un cultivo cuando se ajusta la densidad de siembra en sistemas de alta producción (Maddonni y Otegui, 2004; Sarlangue et al., 2007).

La ausencia de fitocromos B redujo la variabilidad poblacional de las plantas (ver Esquema 4) en alta densidad de siembra a lo largo del ciclo. Llamativamente, en esta densidad la biomasa promedio de las plantas con fitocromos activos (*WT*) fue similar a la de las líneas mutantes (*phyB1* y *phyB2*), pero presentó una mayor uniformidad entre plantas (menor CV). En trabajos previos se había especulado que el origen temprano de la variabilidad poblacional en canopeos de maíz con plántulas uniformemente distribuidas y de similar crecimiento inicial, tiene como agentes responsables a los fitocromos B (Maddonni y Otegui, 2004; Maddonni et al., 2001). Los resultados de esta tesis indican que ambos fitocromos parecerían tener un rol en el establecimiento temprano de jerarquías, ya que la mutación de cualquiera de estos fotorreceptores redujo la variabilidad poblacional. Adicionalmente se pudo comprobar que el grado de variabilidad poblacional en las mono-culturas de *WT* estuvo relacionado con el tamaño de las plantas dependiente de la estación de cada experimento.



Esquema 4: Tamaño de plantas y su variabilidad (CV: coeficiente de variación) en baja y alta densidad de siembra para la línea France 2 (*WT*) y sus iso-líneas con mutaciones en los fitocromos B (*phyB1* y *phyB2*). Globos celestes indican el tamaño de la variación entre plantas.

Por último, este trabajo también intentó esclarecer si las respuestas a la “evasión de sombra” tienen efectos positivos o detrimentales sobre la habilidad competitiva de las plantas y el rendimiento en sistemas de cultivos (Hipótesis iv). Esto fue posible a través de la descripción del crecimiento de las plantas sin fitocromos B1 y B2 en alta densidad de siembra creciendo junto a plantas con fitocromos activos. A través de la medición de cada individuo particular dentro de los canopeos mixtos (poli-culturas) se comprobó que las plantas de maíz sin fitocromos activos son “menos hábiles competidoras” respecto a las plantas *WT* (aceptación primera parte de la Hipótesis iv) debido a su menor altura y área foliar, resultando dominadas por las *WT*. Estas últimas crecieron y rindieron más en términos absolutos y contribuyeron en mayor proporción que las mutantes al rendimiento del cultivo, especialmente en alta densidad de siembra. Llamativamente las poli-culturas con líneas mutantes no pagaron un costo en rendimiento cuando se las comparó con las mono-culturas *WT* (rechazo de la segunda parte de la Hipótesis iv).

El diseño experimental de las mono y poli-culturas permitió también calcular índices que describen relaciones funcionales entre los componentes de un canopeo mixto, e.g. LER (Fukai, 1993; Monzon et al., 2014). Los valores de LER obtenidos sugieren que en ambientes más restrictivos para el crecimiento (Exp 1) las poli-culturas *WT/phyB1*, *WT/phyB2* y *phyB1/phyB2* en alta densidad de siembra, resultaron más beneficiosas ($LERs > 1$) en términos de rendimiento (principio de producción competitiva; Vandermeer, 1989) que las mono-culturas. Cuando el ambiente permitió un mayor crecimiento para las plantas (Exp 2) las poli-culturas se comportaron en general de manera similar que las mono-culturas (i.e. LERs cercanos a 1).

4.2 Avances logrados en el conocimiento

4.2.1 Sobre los efectos de los fitocromos en distintos niveles de organización:

Hasta el momento, sólo un trabajo con la línea de maíz France 2 describió los efectos de los fitocromos B sobre algunos rasgos de plántulas y plantas adultas de interés agronómico (Sheehan et al., 2007). Por otro lado, mediciones de rasgos arquitecturales de planta en híbridos de maíz sometidos a filtros con distintas relaciones de R/RL sugerían que los fitocromos B estaban involucrados en la orientación azimutal de las hojas, la elongación de los tallos y la producción de macollos (Maddonni et al., 2002). En ésta tesis se evaluaron los rasgos de planta intervinientes en la captura de radiación en una línea de maíz (*WT*) y sus mutantes de fitocromo B1 y B2 cultivadas en densidades de siembra contrastantes (variación en R/RL) permitiendo así contrastar un modelo teórico del rol de cada fitocromo B sobre estos rasgos (la Hipótesis i fue evaluada para cada rasgo; ver modelo teórico y resultados en Esquema 1 y 2) permitiendo identificar redundancia o no de los fitocromos B sobre estas respuestas (Hipótesis ii; ver resumen de resultados en Esquema 2).

La información existente del efecto de los fitocromos sobre el crecimiento celular de las láminas de las hojas fue previamente reportada por Liu et al. (2012) en líneas de arroz con las mismas mutaciones. En esta tesis se hicieron similares mediciones en líneas de maíz (France 2) en ambientes contrastes de calidad de luz, aportando fuertes evidencias de los efectos de ambos fitocromos B sobre la división celular sin afectar la expansión celular.

4.2.2 Sobre los determinantes eco-fisiológicos de la producción de biomasa y el rendimiento a nivel de cultivo y la competencia intra-específica:

Hasta el momento sólo un trabajo evaluó la performance de plantas con “sobre-expresión” de fitocromos B a nivel de canopeo en papa (*Solanum tuberosum*) (Boccalandro et al., 2003) donde la única variable registrada en este nivel fue la cobertura (en el mencionado trabajo también se presenta una detallada información sobre otros rasgos fisiológicos en niveles inferiores). En esta tesis se describieron los efectos de las líneas mutantes de

fitocromos B sobre las variables que definen el crecimiento de un cultivo y su rendimiento según el modelo adaptado de Monteith y Moss (1977) y Evans (1993) (ver resumen de resultados en el Esquema 3). Más aún, se reportaron los efectos de los fitocromos B sobre el establecimiento de jerarquías desde las etapas tempranas del cultivo de maíz; hecho que hasta el momento había sido especulado (Maddonni et al., 2001; 2002; Maddonni y Otegui, 2004) pero no puesto a prueba (Hipótesis iii).

Por último, este trabajo es el primero en reportar los efectos de las plantas con o sin fitocromos activos sobre las relaciones de competencia en canopeos mixtos. Esta interpretación permitió identificar que las plantas con fitocromos inactivos (*phyB1* y *phyB2*) son dominadas en su crecimiento (i.e. menor habilidad competitiva) por las plantas *WT* con fitocromos activos, pero este establecimiento de jerarquías no causa mayores penalidades en el rendimiento de la poli-cultura en comparación con una mono-cultura constituida por plantas con PHY Bs activos (*WT*) (Hipótesis iv).

4.3 Aplicaciones futuras:

Los resultados del Capítulo 2, permitieron identificar el rol de los fitocromos B sobre las respuestas arquitecturales de las plantas de maíz a la densidad de siembra según el modelo teórico adaptado de Smith (2000) y Casal (2013) (Esquema 1). Contrastar estas líneas (*WT*, *phyB1* y *phyB2*) en experimentos similares con mediciones de Pfr activo daría un mayor soporte a este modelo predictivo (Sheehan et al., 2004). Por otra parte, mediciones conjuntas de la calidad de luz (R/RL) y de los rasgos arquitecturales durante todo el ciclo ampliarían el entendimiento de la dinámica de estas respuestas en el espacio y tiempo.

A nivel de canopeo, sólo en el Exp 2. se describió la acumulación de biomasa en el periodo crítico de las líneas *WT*, *phyB1* y *phyB2* en densidades de siembra contrastantes en función de la IRAF acumulada permitiendo estimar la EUR. Sería necesario repetir esta información ya que se registraron cambios promisorios en la EUR a favor la línea *phyB2*. Este mecanismo resultaría de importancia en la selección/mejoramiento de materiales para alta densidad de siembra.

Por otro lado, en las mono-culturas de la línea *phyB2* se observó un mayor índice de fertilidad de espigas en alta densidad respecto a la *WT* (hecho que no había sido especulado). Experimentos donde se contraste un mayor rango de densidades de siembra y se evalúen variables de crecimiento y su partición entre órganos vegetativos y reproductivos como así

también mediciones de hormonas (e.g. Auxinas, Giberelinas y Brassinosteroides; Casal, 2013) involucradas en el crecimiento, ayudarían al entendimiento de este hallazgo.

4.5 Implicancias futuras:

Un aspecto a tener en cuenta, es que los PhyB aparte de ser responsables de las respuestas anteriormente descritas, se encuentran involucrados en los mecanismos de la percepción del día, la estación del año y el desencadenamiento de la floración (Andrés y Coupland, 2012). En éste trabajo no se analizaron variables concernientes al desarrollo pero este hecho sería de enorme relevancia ya que éste proceso regula la longitud del ciclo de vida de ésta especie. Esta cuestión no es menor ya que la sincronización del ciclo ontogénico y la estación de crecimiento del cultivo es una variable de fuerte impacto sobre el rendimiento (Cirilo y Andrade, 1994a, 1994b) .

Éste trabajo solo ha descrito rasgos de los órganos vegetativos aéreos de las líneas estudiadas (France 2). Hasta el momento existe muy poca información de cómo los fitocromos B afectan el crecimiento y desarrollo de órganos subterráneos. Liu et al. (2012) describió respuestas en raíces de plantas de arroz (*Oryza sativa*) no encontrando diferencias en longitud, diámetro y densidad radical entre las líneas *WT* y sus respectivos mutantes, sin embargo la mediciones fueron realizadas en una etapa muy temprana de desarrollo (6 hojas expandidas), y el experimento fue realizado en macetas y en invernadero. Queda de manifiesto que sería necesario ampliar el conocimiento del rol de los fitocromos B del maíz sobre los órganos subterráneos de cada individuo y en condiciones de cultivo. Cambios en la relación tallo/raíz gobernados por los fitocromos pueden comprometer la captura de recursos edáficos de las plantas no sólo entre individuos de la misma especie sino también en competencia con malezas (Rajcan y Swanton, 2001).

Por otro lado, haber podido asociar cada rasgo con cada foto-receptor significa el punto de inicio para el estudio de las vías de señalización “aguas abajo”. Por ejemplo, el afinamiento de tallos asociado al *PhyB1* es de suma relevancia en los programas de mejoramiento ya que evitar esta respuesta al incremento en la densidad de siembra disminuiría el vuelco de las plantas (Sangoi et al. 2002).

Por último, ésta tesis ha dejado de manifiesto el rol de los fitocromo B sobre el crecimiento de las plantas de maíz ante cambios en la densidad de siembra y su impacto sobre el crecimiento del cultivo y en el rendimiento. Más aún, se esclareció el rol de los fitocromos B

en las relaciones de competencia intra-específica y en la habilidad competitiva de cada individuo en densidades de siembra contrastantes. Esta información resulta de importancia para futuros estudios relacionados con el arreglo espacial de plantas según las condiciones del ambiente y el establecimiento de jerarquías entre plantas (competencia intra-específica), para poder diseñar sistemas de alta producción de maíz y cultivos mixtos entre especies de distinta habilidad competitiva en poli-culturas con superposición de sus componentes en el espacio (e.g. inter-siembra maíz-soja).

Capítulo 5

Bibliografía

Bibliografía:

- Andrade, F.H., 1995. Analysis of growth and yield of maize, sunflower and soybean grown at Balcarce, Argentina. *F. Crop. Res.* 41, 1–12.
- Andrade, F.H., Abbate, P.E., 2005. Response of Maize and Soybean to Variability in Stand Uniformity. *Agron. J.* 97, 1263–1269.
- Andrade, F.H., Vega, C., Uhart, S., Cirilo, A., Cantarero, M., Valentinuz, O., 1999. CROP PHYSIOLOGY & METABOLISM Kernel Number Determination in Maize. *Crop Sci.* 39, 453–459.
- Andrés, F., Coupland, G., 2012. The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nat. Rev. Genet.* 13, 627–39.
- Ballare, C.L., Sánchez, R.A., Scopel, A.L., Casal, J.J., Ghera, C.M., 1987. Early detection of neighbour plants by phytochrome perception of spectral changes in reflected sunlight. *Plant, Cell Environ.* 10, 551–557.
- Ballare, C.L., Scopel, a. L., Sanchez, R. a., 1997. Foraging for light: photosensory ecology and agricultural implications. *Plant, Cell Environ.* 20, 820–825.
- Berntson, G.M., Wayne, P.M., 2000. Characterizing the Size Dependence of Resource Acquisition within Crowded Plant Populations. *Ecology* 81, 1072–1085.
- Boccalandro, E., Ploschuk, E.L., Yanovsky, M.J., Sánchez, R.A., Gatz, C., Casal, J.J., 2003. Increased Phytochrome B Alleviates Density Effects on Tuber Yield of Field Potato Crops. *Plant Physiol.* 133, 1539–1546.
- Boccalandro, H.E., Rugnone, M.L., Moreno, J.E., Ploschuk, E.L., Serna, L., Yanovsky, M.J., Casal, J.J., 2009. Phytochrome B enhances photosynthesis at the expense of water-use efficiency in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 150, 1083–1092.
- Boomsma, C.R., Santini, J.B., Tollenaar, M., Vyn, T.J., 2009. Maize Morphophysiological Responses to Intense Crowding and Low Nitrogen Availability: An Analysis and Review. *Agron. J.* 101, 1426–1452.
- Boote, K.J., Loomis, R.S., 1991. The prediction of canopy assimilation., in: Boote, K.J., Loomis, R.S. (Eds.), *Modeling Crop Photosynthesis from Biochemistry to Canopy*. Madison WI, pp. 109–140.
- Boote, K.J., Pickering, N.B., 1994. Modeling Photosynthesis of Row Crop Canopies. *HortScience* 29, 1423–1434.
- Carabelli, M., Possenti, M., Sessa, G., Ciolfi, A., Sassi, M., Morelli, G., Ruberti, I., 2007. Canopy shade causes a rapid and transient arrest in leaf development through auxin-induced cytokinin oxidase activity. *Genes Dev.* 21, 1863–8.
- Casal, J.J., 2012. Shade avoidance. *Arab. B.* 10, 1–19.

- Casal, J.J., 2013. Photoreceptor signaling networks in plant responses to shade. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64, 403–27.
- Casal, J.J., Ballare, C.L., 2000. Light signals perceived by crop and weed plants. *F. Crop. Res.* 67, 149–160.
- Casal, J.J., Sanchez, R.A., 1994. Overexpression of oat phytochrome A gene differentially affects stem growth responses to red / far-red ratio signals characteristic of sparse or dense canopies. *Plant, Cell Environ.* 17, 409–417.
- Casal, J.J., Sánchez, R.A., Botto, J.F., 1998. Modes of action of phytochromes. *J. Exp. Bot.* 49, 127–138.
- Casper, B.B., Jackson, R.B., 1997. Plant Competition Underground. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 28, 545–570.
- Childs, K.L., Miller, F.R., Cordonnier-Pratt, M.M., Pratt, L.H., Morgan, P.W., Mullet, J.E., 1997. The sorghum photoperiod sensitivity gene, Ma3, encodes a phytochrome B. *Plant Physiol.* 113, 611–9.
- Christensen, A.H., Quail, P.H., 1989. Structure and expression of a maize phytochrome-encoding gene. *Gene* 85, 381–390.
- Cirilo, A.G., Andrade, F.H., 1994a. Sowing Date and Maize Productivity: I. Crop Growth and Dry Matter Partitioning. *Crop Sci.* 34, 1039–1043.
- Cirilo, A.G., Andrade, F.H., 1994b. Sowing Date and Maize Productivity: II. Kernel Number Determination. *Crop Sci.* 34, 1044–1046.
- D’Andrea, K.E., Otegui, M.E., Cirilo, a. G., Eyherabide, G., 2006. Genotypic Variability in Morphological and Physiological Traits among Maize Inbred Lines—Nitrogen Responses. *Crop Sci.* 46, 1266.
- Deng, J., Ran, J., Wang, Z., Fan, Z., Wang, G., Ji, M., Liu, J., Wang, Y., Liu, J., Brown, J.H., 2012. Models and tests of optimal density and maximal yield for crop plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 1–6.
- Dizeo de Strittmatter, C.G., 1973. Nueva técnica de diafanización. *Boletín la Soc. Argentina Botánica* 15, 126–129.
- Duncan, W.G., 1971. Leaf Angles, Leaf Area, and Canopy Photosynthesis. *Crop Sci.* 11, 482–485.
- Edmeades, G.O., Daynard, T.B., 1979. The development of plant-to-plant variability in maize at different planting densities. *Can. J. plant Sci.* 59, 561–576.
- Evans, L.T., 1993. Physiological aspects of crop improvement., in: Evans, L.T. (Ed. . (Ed.), *Crop Evolution, Adaptation and Yield*. Cambridge University Press, pp. 169–268.
- Fukai, S., 1993. Intercropping- bases of productivity. *F. Crop. Res.* 34, 239–245.

- Gosse, G., Varlet-Granche, C., Bonhomme, R., Chartier, M., Allirand, J., Lemaire, G., 1986. Production maximale de matière sèche et rayonnement solaire intercepté par un couvert végétal. *Agronomie* 6, 47–56.
- Hanumappa, M., Pratt, L., Cordonnier-Pratt, M., Deitzer, G., 1999. A photoperiod-insensitive barley line contains a light-labile phytochrome B. *Plant Physiol.* 119, 1033–40.
- Hashemi, A.M., Stephen Herbert, J., Putnam, D.H., 2005. Yield Response of Corn to Crowding Stress. *Agron. J.* 97, 839–846.
- Holmes, M.G., Smith, H., 1977. The function of phytochrome in the natural environment II. The influence of vegetation canopies on the spectral energy distribution of natural daylight. *Photochem. Photobiol.* 25, 539–545.
- Johansen D, A., 1940. *Plant microtechnique*. New York, NY.
- Kasperbauer, M.J., Karlen, D.L., 1994. Plant Spacing and Reflected Far-Red Light Effects on Phytochrome-Regulated Photosynthate Allocation in Corn Seedlings. *Crop Sci.* 34, 1564–1569.
- Kiniry, J.R., Jones, C.A., O'toole, J.C., Blanchet, R., Cabelguenne, M., Spanel, D.A., 1989. Radiation use efficiency in biomass accumulation prior to grain-filling for five grain-crop species. *F. Crop. Res.* 20, 51–64.
- Kiniry, J.R., Ritchie, J.T., Musser, R.L., 1983. Dynamic Nature of the Photoperiod Response in Maize. *Agron. J.* 75, 700–703.
- Kruk, B., Satorre, E.H., 2003. Densidad y arreglo espacial del cultivo, in: *Producción de Granos. Bases Funcionales Para Su Manejo*. pp. 279–312.
- Laserna, M.P., Maddonni, G. a., López, C.G., 2012. Phenotypic variations between non-transgenic and transgenic maize hybrids. *F. Crop. Res.* 134, 175–184.
- Liu, J., Zhang, F., Zhou, J., Chen, F., Wang, B., Xie, X., 2012. Phytochrome B control of total leaf area and stomatal density affects drought tolerance in rice. *Plant Mol. Biol.* 78, 289–300.
- Luque, S.F., Cirilo, A.G., Otegui, M.E., 2006. Genetic gains in grain yield and related physiological attributes in Argentine maize hybrids. *F. Crop. Res.* 95, 383–397.
- Maddonni, G.A., Chelle, M., Drouet, J.L., Andrieu, B., 2000. Light interception of contrasting azimuth canopies under square and rectangular plant spatial distributions: simulations and crop measurements. *F. Crop. Res.* 70, 1–13.
- Maddonni, G.A., Otegui, M.E., 2004. Intra-specific competition in maize: early establishment of hierarchies among plants affects final kernel set. *F. Crop. Res.* 85, 1–13.
- Maddonni, G.A., 2012. Analysis of the climatic constraints to maize production in the current agricultural region of Argentina—a probabilistic approach. *Theor. Appl. Climatol.* 107, 325–345.

- Maddonni, G.A., Otegui, E., Andrieu, B., Chelle, M., Casal, J.J., 2002. Maize Leaves Turn Away from Neighbors. *Plant Physiol.* 130, 1181–1189.
- Maddonni, G.A., Otegui, M.E., 1996. Leaf area, light interception, and crop development in maize. *F. Crop. Res.* 48, 81–87.
- Maddonni, G.A., Otegui, M.E., 2006. Intra-specific competition in maize : Contribution of extreme plant hierarchies to grain yield , grain yield components and kernel composition. *F. Crop. Res.* 97, 155–166.
- Maddonni, G.A., Otegui, M.E., Cirilo, A.G., 2001. Plant population density, row spacing and hybrid effects on maize canopy architecture and light attenuation. *F. Crop. Res.* 71, 183–193.
- Mathews, S., Sharrock, R. a., 1997. Phytochrome gene diversity. *Plant, Cell Environ.* 20, 666–671.
- Mayer, L.I., Rossini, M. a., Maddonni, G. A., 2012. Inter-plant variation of grain yield components and kernel composition of maize crops grown under contrasting nitrogen supply. *F. Crop. Res.* 125, 98–108.
- Miralles, D.J., Slafer, G.A., 1997. Radiation interception and radiation use efficiency of near-isogenic wheat lines with different height. *Euphytica* 201, 201–208.
- Monteith, J.L., Moss, C.J., 1977. Climate and the Efficiency of Crop Production in Britain [and Discussion]. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 281, 277–294.
- Monteith, J.L.L., 1965. Light distribution and photosynthesis in field crops. *Ann. Bot.* 29, 17–37.
- Montgomery, E.C., 1911. Correlation studies in corn. Nebraska.
- Monzon, J.P., Mercu, J.L., Andrade, J.F., Caviglia, O.P., Cerrudo, A.G., Cirilo, A.G., Vega, C.R.C., Andrade, F.H., Calviño, P. a., 2014. Maize–soybean intensification alternatives for the Pampas. *F. Crop. Res.* 162, 48–59.
- Morrison, T. a., Kessler, J.R., Buxton, D.R., 1994. Maize Internode Elongation Patterns. *Crop Sci.* 34, 1055.
- Muchow, R.C., Sinclair, T.R., Bennett, J.M., 1990. Temperature and Solar Radiation Effects on Potential Maize Yield across Locations. *Agron. J.* 82, 338–343.
- Nelissen, H., Rymer, B., Jikumaru, Y., Demuynck, K., Van Lijsebettens, M., Kamiya, Y., Inzé, D., Beemster, G.T.S., 2012. A Local Maximum in Gibberellin Levels Regulates Maize Leaf Growth by Spatial Control of Cell Division. *Curr. Biol.* 22, 1183–1187.
- Otegui, M.E., Nicolini, M.G., Ruiz, R.A., Dodds, P.A., 1995. Sowing Date Effects on Grain Yield Components for Different Maize Genotypes. *Agron. J.* 87, 29.
- Pagano, E., Cela, S., Maddonni, G. A., Otegui, M.E., 2007. Intra-specific competition in maize: Ear development, flowering dynamics and kernel set of early-established plant hierarchies. *F. Crop. Res.* 102, 198–209.

- Pagano, E., Maddonni, G. A., 2007. Intra-specific competition in maize: Early established hierarchies differ in plant growth and biomass partitioning to the ear around silking. *F. Crop. Res.* 101, 306–320.
- Passioura, J.B., Angus, J.F., 2010. Improving Productivity of Crops in Water-Limited Environments, 1st ed, *Advances in Agronomy* v106. Elsevier INC.
- Pepper, G.E., Pearce, R.B., Mock, J.J., 1977. Leaf orientation and yield of maize. *Crop Sci.* 17, 883–886.
- Pommel, B., 1990. Influence du poids de la semence et de la profondeur de semis sur la croissance et le développement de la plantule de maïs. *Agronomie* 10, 699–708.
- Rajcan, I., Swanton, C.J., 2001. Understanding maize–weed competition: resource competition, light quality and the whole plant. *F. Crop. Res.* 71, 139–150.
- Ritchie, J.T., NeSmith, D.S., 1991. Temperature and crop development., in: *Modelling Plant and Soil Systems*, *Agronomy Series* 31. ASA-CSSA-SSSA, Madison, USA., pp. 5–29.
- Ritchie, S.W., Hanway, J.J., Benson, G.O., 1993. How a corn plant develops.
- Rossini, M.A., Maddonni, G.A., Otegui, M.E., 2011. Inter-plant competition for resources in maize crops grown under contrasting nitrogen supply and density: Variability in plant and ear growth. *F. Crop. Res.* 121, 373–380.
- Sangoi, L., Gracietti, M., Rampazzo, C., Bianchetti, P., 2002. Response of Brazilian maize hybrids from different eras to changes in plant density. *F. Crop. Res.* 79, 39–51.
- Sarlangue, T., Andrade, F.H., Calviño, P. a., Purcell, L.C., 2007. Why Do Maize Hybrids Respond Differently to Variations in Plant Density? *Agron. J.* 99, 984.
- Sattin, M., Zuin, M.C., Sartorato, I., 1994. Light quality beneath field-grown maize, soybean and wheat canopies-red:far red variations. *Physiol. Plant.* 91, 322–328.
- Sawers R, J., Linley P, J., Farmer P, R., Hanley N, P., Costich DE, T., Brutnell M, J., 2002. TP elongated mesocotyl1, a phytochrome efficient mutant of maize. *Plant Physiol.* 130, 155–163.
- Schwinning, S., 1996. Decomposition Analysis of Competitive Symmetry and Size Structure Dynamics. *Ann. Bot.* 77, 47–57.
- Sheehan, M.J., Farmer, P.R., Brutnell, T.P., 2004. Structure and Expression of Maize Phytochrome Family Homeologs. *Genetics* 167, 1395–405.
- Sheehan, M.J., Kennedy, L.M., Costich, D.E., Brutnell, T.P., 2007. Subfunctionalization of PhyB1 and PhyB2 in the control of seedling and mature plant traits in maize. *Plant J.* 49, 338–53.
- Smith, H., 2000. Phytochromes and light signal perception by plants--an emerging synthesis. *Nature* 407, 585–91.

- Smith, H., Casal, J.J., Jackson, G.M., 1990. Reflection signals and the perception by phytochrome of the proximity of neighbouring vegetation. *Plant, Cell Environ.* 13, 73–78.
- Snaydon, R.W., Satorre, E.H., 1989. Bivariate diagrams for plant competition data: modifications and interpretation, *Journal of Applied Ecology*.
- Stewart, D.W., Dwyer, L.M., 1999. Mathematical Characterization of Leaf Shape and Area of Maize Hybrids. *Crop Sci.* 39, 422–427.
- Takano, M., Inagaki, N., Xie, X., Kiyota, S., Baba-Kasai, A., Tanabata, T., Shinomura, T., 2009. Phytochromes are the sole photoreceptors for perceiving red/far-red light in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 14705–14710.
- Takano, M., Inagaki, N., Xie, X., Yuzurihara, N., Hihara, F., Ishizuka, T., Nishimura, M., Miyao, A., Hirochika, H., Shinomura, T., 2005. Distinct and Cooperative Functions of Phytochromes A, B, and C in the Control of Deetiolation and Flowering in Rice. *Plant Cell* 17, 3311–3325.
- Tardieu, F., Granier, C., Muller, B., 1999. Modelling leaf expansion in a fluctuating environment : are changes in specific leaf area a consequence of changes in expansion rate ? *New Phytol.* 143, 33–43.
- Tetio-Kagho, F., Gardner, F.P., 1988a. Responses of Maize to Plant Population Density. I. Canopy Development, Light Relationships, and Vegetative Growth. *Agron. J.* 80, 930–935.
- Tetio-Kagho, F., Gardner, F.P., 1988b. Responses of Maize to Plant Population Density. II. Reproductive Development, Yield, and Yield Adjustments. *Agron. J.* 80, 935–940.
- Toler, J. E., Murdock, E.C., Stapleton, G.S. and, Wallace, S.U., 1999. Corn leaf orientation effects on light interception, intraspecific competition, and grain yields. *J. Prod. Agric.* 12, 396–399.
- Tollenaar, M., Aguilera, A., 1992. Radiation Use Efficiency of an Old and a New Maize Hybrid. *Agron. J.* 84, 536–541.
- Tollenaar, M., Deen, W., Echarte, L., Liu, W., 2006. Effect of Crowding Stress on Dry Matter Accumulation and Harvest Index in Maize. *Agron. J.* 98, 930.
- Tollenaar, M., Dwyer, L.M., Stewart, D.W., 1992. Ear and Kernel Formation in Maize Hybrids Representing Three Decades of Grain Yield Improvement in Ontario. *Crop Sci.* 32, 432–438.
- Tollenaar, M., Wu, J., 1999. Yield Improvement in Temperate Maize is Attributable to Greater Stress Tolerance. *Crop Sci.* 39, 1597–1604.
- Uhart, S.A., Andrade, F.H., 1991. Source-sink relationships in maize grown in a cool-temperate area. *Agronomie* 11, 863–875.
- Vandermeer, J., 1989. *The ecology of inter-cropping*. Cambridge, New York.
- Vega, C.R.C., Sadras, V.O., 2003. Size-dependent growth and the development of inequality in maize, sunflower and soybean. *Ann. Bot.* 91, 795–805.

Weiner, J., Thomas, S.C., 1986. Size variability and competition. *OIKOS* 47, 211–222.

Williams, W.A., Loomis, R.S., Duncan, W.G., Dovrat, A., Nunez, F.A., 1968. Canopy Architecture at Various Population Densities and the Growth and Grain Yield of Corn. *Crop Sci.* 8, 303–308.